

**Charakterisierung potentieller Virulenzfaktoren von  
*Mycobacterium tuberculosis*:  
Adenylatcyclase Cya und Rv1264, Adhäsın HbhA und die Untereinheit AtpD  
der F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATPase**

---

**Dissertation**

**zur**

**Erlangung der naturwissenschaftlichen Doktorwürde  
(Dr. sc. nat.)**

**Vorgelegt der**

**Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät**

**der**

**Universität Zürich**

**von**

**Dorothea M. Hombach**

**aus**

**Deutschland**

**Promotionskomitee**

**Prof. Dr. Erik C. Böttger (Vorsitz)  
PD Dr. Peter Sander (Leitung der Dissertation)  
Prof. Dr. Walter Schaffner**

**Zürich 2007**

## Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>I</b>
<b>II</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>II</b>
<b>III</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>III</b>
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Die Tuberkulose	1
1.2	Die Gattung <i>Mycobacterium</i>	2
1.3	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3
1.4	<i>M. bovis</i> BCG als Modellsystem	4
1.5	Aufnahme und intrazelluläres Überleben von <i>M. tuberculosis</i> in Makrophagen	5
1.6	Virulenzmodelle von <i>M. tuberculosis</i>	6
1.6.1	Zellkultur-Modelle	6
1.6.2	Tier-Modelle	6
1.7	Virulenzfaktoren von <i>M. tuberculosis</i>	7
1.7.1	Adenylatcyclasen und deren Produkt cAMP als Virulenzfaktor	7
1.7.1.1	Klassifizierung von Adenylatcyclasen	8
1.7.1.2	Adenylatcyclasen der Klasse III	9
1.7.1.3	Adenylatcyclasen im Genom von <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	11
1.7.2	Sekretionsproteine als Virulenzfaktoren	12
1.7.3	Die $\beta$ -Untereinheit der $F_0F_1$ -ATP Synthase als Virulenzfaktor	16
1.7.3.1	Die $\beta$ -Untereinheit der $F_0F_1$ -ATP Synthase von <i>M. tuberculosis</i>	17
1.7.4	Oberflächen-assoziierte Proteine als Virulenzfaktoren	18
1.7.4.1	Heparin-bindendes Hämagglutinin Adhäsın (HbhA) von <i>M. tuberculosis</i> als Virulenzfaktor	19
1.8	Ziel der Arbeit	20
<b>2</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>21</b>
2.1	Chemikalien	21
2.2	Enzyme, Grössenstandards, Kits, Membranen	21

---

<b>2.3</b>	<b>Geräte</b>	<b>22</b>
<b>2.4</b>	<b>Nährmedien</b>	<b>22</b>
2.4.1	Nährmedien für Bakterienkulturen	22
2.4.2	Nährmedien für Zellkultur	23
<b>2.5</b>	<b>Zusätze für Nährmedien und Agarplatten</b>	<b>24</b>
<b>2.6</b>	<b>Puffer und Lösungen</b>	<b>24</b>
2.6.1	Puffer für Mini-Präparation	25
2.6.2	Southern Blot-Lösungen	25
2.6.3	Western Blot-Lösungen	26
<b>2.7</b>	<b>DNA-Sonden</b>	<b>27</b>
<b>2.8</b>	<b>Antikörper</b>	<b>27</b>
<b>2.9</b>	<b>Oligonukleotide</b>	<b>27</b>
2.9.1	Oligonukleotide für die PCR	28
2.9.2	Oligonukleotide für Sequenzierungen	29
<b>2.10</b>	<b>Bakterienstämme</b>	<b>30</b>
<b>2.11</b>	<b>Plasmide</b>	<b>31</b>
<b>2.12</b>	<b>Zelllinien und primäre Zellen</b>	<b>36</b>
<b>2.13</b>	<b>Mausstämme</b>	<b>36</b>
<b>3</b>	<b>METHODEN</b>	<b>37</b>
<b>3.1</b>	<b>Mikrobiologische Methoden</b>	<b>37</b>
3.1.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	37
3.1.2	Kultivierung von <i>M. tuberculosis</i>	37
3.1.3	Herstellung kompetenter Zellen und Transformation	37
3.1.3.1	Calciumchlorid-kompetente <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	37
3.1.3.2	Elektrokompetente <i>M. tuberculosis</i>	38
3.1.3.3	Bestimmung der Zelldichte	38
<b>3.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>39</b>
3.2.1	Amplifizierung von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion	39
3.2.2	Fusions-PCR	39
3.2.3	Methoden der Plasmid-DNA-Isolierung	40
3.2.3.1	Plasmid-DNA-Isolierung im kleinen Massstab	40
3.2.3.2	Plasmid-DNA-Isolierung im mittleren Massstab nach Promega	40
3.2.4	Isolierung genomischer DNA aus Mykobakterien	41

3.2.5	Ethanolpräzipitation von DNA	41
3.2.6	Konzentrationsbestimmung von DNA	41
3.2.7	Restriktion von DNA	41
3.2.8	Dephosphorylierung linearisierter DNA	42
3.2.9	Entfernen von Überhängen von linearisierter DNA	42
3.2.10	Ligation von DNA-Fragmenten	42
3.2.11	Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren	43
3.2.12	Extraktion von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel	43
3.2.13	Aufreinigung von PCR-Produkten	43
3.2.14	Sequenzierung von DNA	43
3.2.15	Southern Blot	44
3.2.15.1	Herstellung von DNA-Sonden	44
3.2.15.2	Southern Blot Analyse	44
3.2.15.3	Strippen von Southern Blots	44
3.2.16	Inaktivierung von <i>M. tuberculosis</i> Genen	45
3.2.16.1	Inaktivierung von Rv1264	45
3.2.16.2	Inaktivierung von <i>cya</i>	45
3.2.16.3	Inaktivierung von Rv1264 und <i>cya</i>	46
3.2.16.4	Inaktivierung von <i>atpD</i>	46
3.2.16.5	Inaktivierung von <i>hbbA</i>	46
3.2.17	Generierung von AtpD-Expressionskonstrukten	47
3.2.17.1	Generierung von AtpD-Expressionskonstrukten mit N-terminaler Erkennungssequenz	47
3.2.17.2	Generierung von AtpD-Expressionskonstrukten mit C-terminaler Erkennungssequenz	48
<b>3.3</b>	<b>Biochemische und immunologische Methoden</b>	<b>49</b>
3.3.1	Proteinreinigung	49
3.3.1.1	Totalprotein-Extrakte aus Mykobakterien	49
3.3.1.2	Ethanolpräzipitation von Proteinen	49
3.3.1.3	Totalprotein-Extrakte der überexprimierten His <sub>6</sub> -Fusionsproteine	49
3.3.2	Horizontale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	49
3.3.3	Immunoblot-Analyse (Western Blot)	50
<b>3.4</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>51</b>
3.4.1	Zellzahlbestimmung von eukaryotischen Zellen	51
3.4.2	Kultivierung von Zelllinien	51
3.4.2.1	J-774	51
3.4.2.2	A-549	51
3.4.2.3	L-929	51
3.4.3	Einfrieren von Zellen	52
3.4.4	Auftauen von Zellen	52
3.4.5	Herstellung von LCCM 1 und 2	52
3.4.6	Gewinnung von BMDM aus Mäusen	52
3.4.7	<i>In vitro</i> Infektionen	53
3.4.7.1	Intrazelluläres Überleben von <i>M. tuberculosis</i>	53
3.4.7.2	Bestimmung der Phagozytoserate von <i>M. tuberculosis</i>	53

3.4.7.3	Lyse der eukaryotischen Zellen	54
3.4.8	<i>In vivo</i> Infektionsexperimente	54
3.4.8.1	Histologie	54
3.4.8.2	<i>In vivo</i> Infektionsexperimente: Adenylatcyclasen	54
3.4.8.3	<i>In vivo</i> Infektionsexperimente: <i>hbhAΔ</i>	55
3.4.8.4	Bestimmung der <i>in vivo</i> Phagozytoserate von <i>hbhAΔ</i>	55
3.4.8.5	Bestimmung der <i>in vitro</i> Phagozytoserate von <i>hbhAΔ</i>	55
3.4.8.6	Bestimmung der Phagozytoserate in Gegenwart von Heparin	56
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>57</b>
<b>4.1</b>	<b>Adenylatcyclasen als Virulenzfaktor</b>	<b>57</b>
4.1.1	Adenylatcyclase Rv1264	57
4.1.1.1	Charakterisierung der pH sensitiven Rv1264 Adenylatcyclase Mutante von <i>M. tuberculosis</i>	57
4.1.1.1.1	Inaktivierung von <i>M. tuberculosis</i> Rv1264	58
4.1.1.1.2	<i>In vitro</i> Charakterisierung von <i>M. tuberculosis</i> Rv1264Δ	59
4.1.1.1.3	<i>In vivo</i> Charakterisierung von <i>M. tuberculosis</i> Rv1264Δ	59
4.1.2	Adenylatcyclase Rv1625c ( <i>cya</i> )	62
4.1.2.1	Charakterisierung der <i>M. tuberculosis</i> Adenylatcyclase <i>cya</i> Mutante	62
4.1.2.1.1	Inaktivierung von <i>M. tuberculosis</i> <i>cya</i>	62
4.1.2.1.2	<i>In vitro</i> Charakterisierung von <i>M. tuberculosis</i> <i>cyaΔ</i>	63
4.1.2.2	<i>In vivo</i> Charakterisierung von <i>M. tuberculosis</i> <i>cyaΔ</i>	64
4.1.3	Adenylatcyclasen-Doppel-Knockout Rv1264/ <i>cya</i>	65
4.1.3.1	Charakterisierung der <i>M. tuberculosis</i> Rv1264/ <i>cya</i> Doppelmutante	65
4.1.3.1.1	Inaktivierung von <i>M. tuberculosis</i> Rv1264/ <i>cya</i>	65
4.1.3.2	<i>In vitro</i> Charakterisierung von <i>M. tuberculosis</i> Rv1264Δ/ <i>cyaΔ</i>	66
4.1.3.2.1	<i>In vitro</i> Wachstum in Flüssigmedium 7H9	66
4.1.3.2.2	Intrazelluläres Überleben in Makrophagen	66
4.1.3.3	<i>In vivo</i> Charakterisierung von <i>M. tuberculosis</i> Rv1264Δ/ <i>cyaΔ</i>	67
<b>4.2</b>	<b>Sekretionsproteine als Virulenzfaktoren</b>	<b>69</b>
4.2.1	Die β-Untereinheit der F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> -ATP Synthase von <i>M. tuberculosis</i>	69
4.2.1.1	Untersuchungen zu <i>M. tuberculosis</i> Rv1310 ( <i>atpD</i> )	69
4.2.1.1.1	Inaktivierung von <i>M. tuberculosis</i> <i>atpD</i>	69
4.2.1.1.2	Expression und Lokalisation von <i>M. tuberculosis</i> AtpD in Mykobakterien	70
4.2.1.1.2.1	Nachweis der Expression und Lokalisation von AtpD	72
<b>4.3</b>	<b>Oberflächenproteine als Virulenzfaktoren</b>	<b>75</b>
4.3.1	Das Adhäsın HbhA	75
4.3.1.1	Charakterisierung der <i>M. tuberculosis</i> <i>hbhA</i> Mutante	75
4.3.1.1.1	Inaktivierung von <i>M. tuberculosis</i> <i>hbhA</i>	75
4.3.1.1.2	<i>In vivo</i> Charakterisierung von <i>M. tuberculosis</i> <i>hbhAΔ</i>	76
4.3.1.1.3	Untersuchungen zur Virulenzattenuation von <i>M. tuberculosis</i> <i>hbhAΔ</i>	79
4.3.1.1.3.1	<i>In vitro</i> Charakterisierung von <i>M. tuberculosis</i> <i>hbhAΔ</i>	79
4.3.1.1.3.2	Phagozytose von <i>M. tuberculosis</i> <i>hbhAΔ</i>	80

4.3.1.1.3.3	Intrazelluläres Überleben von <i>M. tuberculosis</i> <i>hbhAΔ</i> in BMDM	82
4.3.1.1.3.4	Hemmung der Phagozytose von <i>M. tuberculosis</i> H37Rv in BMDM durch Heparin	83
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>85</b>
<b>5.1</b>	<b>Virulenzfaktoren von <i>M. tuberculosis</i></b>	<b>85</b>
5.1.1	Adenylatcyclasen und deren Produkt cAMP	86
5.1.2	Charakterisierung der Adenylatcyclase Mutanten	88
5.1.3	AtpD	91
5.1.4	HbhA	94
5.1.4.1	<i>M. tuberculosis</i> HbhA ist an der Interaktion mit primären Makrophagen beteiligt	95
<b>6</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>97</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b>	<b>109</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis	109
7.2	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	113
7.3	Lebenslauf	115
7.4	Publikationen	117

---

# I Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne die Unterstützung vieler anderer nicht möglich gewesen. Ihnen allen möchte ich an dieser Stelle danken.

Herrn Prof. Dr. Erik C. Böttger und Herrn PD Dr. Peter Sander, die mir die Möglichkeit gaben am Institut für Medizinische Mikrobiologie diese Dissertation anzufertigen, möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen. Ihr stetes Interesse und ihre hilfreiche Kritik trugen wesentlich zum Fortgang dieser Arbeit bei. Desweiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Walter Schaffner bedanken, der an der Betreuung der Arbeit als Fakultätsmitglied der MNF beteiligt war.

Ein herzlicher Dank gilt auch unseren Kollaborationspartnern Prof. Dr. Stefan Ehlers und Dr. Christine Keller (Forschungszentrum Borstel, Deutschland) sowie Prof. Dr. Alexander S. Apt (*Central Institute for Tuberculosis*, Moskau, Russland) für die Durchführung der Maus-Infektions-Experimente.

Dem Bachelor Studenten Mathias Schmalen danke ich für die Unterstützung. Die Arbeit mit ihm bereicherte meine tägliche Routine und gab mir wertvolle Einblicke in die Lehrtätigkeit.

Ein grosser Dank gebührt auch allen jetzigen und ehemaligen Labormitgliedern. Die hervorragende Arbeitsatmosphäre im Labor und die ständige Diskussionsbereitschaft empfand ich als grosse Bereicherung. Meine Kollegen halfen mir über kleine und grössere Schwierigkeiten bei der Dissertation hinweg. Daher gebührt ein grosses Dankeschön Sonja Gempeler, Dr. Mandana Rezwan, Dr. Silvana Rampini, Tom Grau und Dr. Silke Peter.

Ich danke meinen Mann Michael für seine Unterstützung, die ich von ihm immer erhalten habe.

Am Ende gilt mein besonderer Dank jedoch meinen Eltern. Sie haben mich ermutigt, die Dissertation in der Schweiz anzufertigen. Ihr ständiges Interesse und die kontinuierliche Unterstützung während des gesamten Studiums haben zum Erfolg dieser Arbeit wesentlich beigetragen.

## II Zusammenfassung

*Mycobacterium tuberculosis*, der Erreger der Tuberkulose, verursacht die wohl häufigste Infektionskrankheit. Auch wenn bereits einige Virulenzfaktoren beschrieben wurden, sind die molekularen Mechanismen der Virulenz von *M. tuberculosis* weitestgehend unbekannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung potentieller Virulenzfaktoren von *M. tuberculosis*: 1) die säure-aktivierte Adenylatcyclase Rv1264 sowie der Säuger-ähnlichen Adenylatcyclase Rv1625c (*cya*), 2) des Adhäsins HbhA und 3) der Untereinheit AtpD der  $F_0F_1$ -ATPase. Zur Erreichung dieses Ziels wurden gezielt Genaustauschmutanten und überexprimierende Mutanten von *M. tuberculosis* hergestellt. Diese Mutanten wurden anschliessend genetisch und biochemisch charakterisiert sowie das Wachstumsverhalten in *in vitro*, *in vivo* und *ex vivo* Infektionsmodellen untersucht.

- Die Adenylatcyclasen der Klasse III Rv1264 und *cya* von *M. tuberculosis* wurden durch gezielten Genaustausch inaktiviert. Die Mutante Rv1264 $\Delta$  wie auch die *cya* $\Delta$  Mutante zeigen Wildtyp-Eigenschaften im aerogenen, akuten Maus-Infektions-Modell. Einer möglichen Redundanz der beiden Adenylatcyclasen wurde durch die Generierung einer *M. tuberculosis* Rv1264 $\Delta$ /*cya* $\Delta$  Doppelmutante nachgegangen. Diese Doppelmutante wies ebenfalls einen Wildtyp-Phänotyp auf. Diese Befunde legen den Schluss nahe, dass eine bzw. mehrere der 13 verbleibenden Adenylatcyclasen den Verlust von Rv1264 und *cya* kompensieren können.
- Frühere Ergebnisse wiesen daraufhin, dass die  $\beta$ -Untereinheit (AtpD) der  $F_0F_1$ -ATPase von *M. tuberculosis* ein in die Wirtszelle sekretierter Virulenzfaktor sein könnte. Durch Genaustauschversuche konnte gezeigt werden, dass AtpD ein essentielles Protein von *M. tuberculosis* darstellt. Mit der Generierung rekombinanter Mutanten in *M. bovis* BCG und *M. tuberculosis*, die N- und C-terminal markiertes AtpD-Protein exprimieren, wurden wichtige Werkzeuge für die Untersuchungen des Sekretionsmechanismus von AtpD geschaffen.
- Zur Untersuchung der Bedeutung des Adhäsins HbhA bei der Interaktion mit der Wirtszelle wurde *hbhA* durch gezielten Genaustausch inaktiviert. Die *M. tuberculosis* Mutante *hbhA* $\Delta$  zeigte sowohl im intratrachealen als auch im intravenösen Maus-Infektions-Modell einen attenuierten Phänotyp. Weiterführende Untersuchungen in verschiedenen Infektionsmodellen und mit unterschiedlichen Zelltypen zeigten, dass HbhA ein generelles Adhäsins für professionelle Phagozyten darstellt. HbhA erleichtert die Aufnahme von *M. tuberculosis* in diese wichtigen Wirtszellen.



### III Summary

*Mycobacterium tuberculosis*, the causative agent of tuberculosis, is one of the world's most common pathogens. Despite significant efforts, little is known about the mechanisms of *M. tuberculosis* pathogenicity at the molecular level.

The aim of this study was the investigation of putative *M. tuberculosis* virulence factors: 1) the acid-activated adenylate cyclase Rv1264 and the mammalian-like adenylate cyclase Rv1625c (*cya*), 2) the adhesin HbhA, 3) the  $\beta$ -subunit of the  $F_0F_1$ -ATPase, the AtpD. Genetic techniques (allelic replacement techniques and expression cloning) were applied to generate knock-out mutants and overexpression mutants. These mutants were subsequently characterized at the genetic and biochemical level as well as in *in vitro*, *in vivo* and *ex vivo* infection models of tuberculosis.

- The class III adenylate cyclases Rv1264 and *cya* of *M. tuberculosis* were inactivated by allelic replacement. Inactivation of *M. tuberculosis* Rv1264 $\Delta$  and *cya* $\Delta$  did not affect the course of infection, neither with respect to bacterial growth in different organs, nor dissemination or histopathology. A possible redundancy of Rv1264 and *cya* cyclases was investigated by generation of a *M. tuberculosis* Rv1264 $\Delta$ /*cya* $\Delta$  double knock-out mutant. In the *in vivo* mouse infection model *M. tuberculosis* Rv1264 $\Delta$ /*cya* $\Delta$  showed the same *in vivo* characteristics as the wild-type. The results indicate that one or more of the remaining 13 mycobacterial ACs may compensate for the loss of Rv1264/*cya* adenylate cyclase activity.
- Previous studies suggested that the  $\beta$ -subunit (AtpD) of the  $F_0F_1$ -ATPase from *M. tuberculosis* is a virulence factor secreted into host cells. Inactivation by allelic replacement revealed that AtpD is essential for *M. tuberculosis*. Recombinant *atpD* mutants in *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis* expressing AtpD with N- and C-terminal tags are important tools for further investigations of the secretion mechanism of AtpD.
- The *M. tuberculosis* *hbhA* $\Delta$  deletion mutant display an attenuated phenotype, a reduction of the bacterial load in the lung after intratracheal and intravenous infection as well as a delay in colonization of the spleen; mice infected with the *hbhA* $\Delta$  mutant survived longer than control mice. By rigorously exploiting various routes of infection (*in vivo*, *in vitro*) and by analysis of different cell-type, subsequent analyses demonstrated that HbhA is an important ligand for professional phagocytes. HbhA facilitates uptake by these important cell-types.

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Tuberkulose

Die Tuberkulose ist eine bakterielle Infektionskrankheit, die sich vor allem als Lungentuberkulose manifestiert. Grundsätzlich kann aber jedes Organ befallen sein. Tuberkulose ist eine alte Krankheit, welche die Menschheit schon lange begleitet. Es ist belegt, dass Tuberkulose bereits vor 4000 Jahren auftrat. Schon an Knochen ägyptischer Mumien aus der Zeit von 3000-2400 v. Ch. wurden Zeichen tuberkulöser Erkrankungen gefunden und schon Hippokrates berichtete im 5. Jahrhundert v. Ch. von der „Phthisis“ (griechisch: Schwindsucht). In Europa erreichte die Verbreitung der Tuberkulose zum Ende des 19. Jahrhunderts einen Höhepunkt: in Berlin war sie die häufigste Todesursache und eine Studie aus Paris belegt, dass 36% (250/696) der nicht altersbedingten Todesfälle durch Tuberkulose verursacht waren (Grandmann, 2005; Smith, 2003). Nach der Entdeckung des Erregers der Tuberkulose, *Mycobacterium tuberculosis*, im Jahre 1882 war es das Ziel, die Verbreitung der Tuberkulose zu verhindern und die Heilungsmöglichkeiten zu verbessern. Die Errichtung von Sanatorien war eine erste Massnahme. Mit der Entdeckung des Streptomycins 1943/44 und anderer Tuberkulostatika wurden wirksame Behandlungsmöglichkeiten entwickelt und die Erkrankung verschwand zumindest in den entwickelten Ländern der westlichen Welt aus dem Bewusstsein der Bevölkerung. Nachdem 1963/64 Rifampicin als letztes klassisches Tuberkulostatikum entwickelt worden war, wurde die pharmazeutische Forschung praktisch eingestellt.

Global gesehen ist die Tuberkulose auch heute noch eine der häufigsten Todesursachen durch Infektionskrankheiten. An Tuberkulose sterben zur Zeit täglich 5000 Menschen und die Inzidenz, besonders in Afrika, ist ansteigend. Die Prävalenz der Erkrankung ist ausserordentlich hoch. Etwa ein Drittel der Weltbevölkerung ist mit *M. tuberculosis* infiziert. Im Jahre 2004 wurden 8,9 Millionen Neuerkrankungen registriert (WHO, 2005; WHO, 2006). Mangelnde medizinische Versorgung, rasches Bevölkerungswachstum sowie die zunehmende Verbreitung der Immunschwächekrankheit AIDS (Corbett *et al.*, 2003; Frieden *et al.*, 2003) werden für die steigende Prävalenz und Inzidenz verantwortlich gemacht.

Die pulmonale Tuberkulose wird mit einer Kombinationstherapie behandelt, bei der die Tuberkulostatika Isoniazid, Rifampicin, Pyrazinamid und Ethambutol zur Anwendung kommen. Die gleichzeitige Verabreichung mehrerer Medikamente mit unterschiedlichen

Wirkmechanismen verhindert die Resistenzbildung und nutzt synergistische Wirkungen aus. In der Initialphase der Therapie werden vor allem replizierende Bakterien abgetötet und die Infektiosität der Erkrankten stark herabgesetzt. In der anschliessenden Stabilisierungsphase werden auch nicht-replizierende Bakterien über einen Zeitraum von 4-9 Monaten abgetötet. Ein besonderes Problem stellt das Auftreten multiresistenter (MDR) Tuberkulosestämmen dar. MDR-Stämme sind definitionsgemäss mindestens gegen Isoniazid und Rifamicin, häufig auch gegen weitere Tuberkulostatika, resistent (WHO, 2006). Die begrenzte Verfügbarkeit wirksamer Medikamente in den Entwicklungsländern sowie unzureichende bzw. falsche Behandlung („non-compliance“) fördert die Selektion multiresistenter Stämme. Tuberkuloseerkrankungen durch multiresistente Stämme sind besonders in der ehemaligen Sowjetunion und China zu beobachten, in jüngster Zeit auch im südlichen Afrika (Gandhi *et al.*, 2006; WHO, 2006). Infektionen mit multiresistenten Tuberkulosestämmen haben eine langwierige (bis zu 2 Jahre) und kostenintensive Therapie zur Folge (Frieden *et al.*, 2003).

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde mit dem Ziel der Eindämmung der Tuberkulose an der Entwicklung eines Impfstammes gearbeitet. *Mycobacterium bovis* BCG (Bacille Calmette-Guérin) wurde zwischen 1908 bis 1921 durch 230 *in vitro* Passagierungen des virulenten *M. bovis* Stammes, dem Erreger der Rindertuberkulose, generiert (Calmette & Guérin, 1920). Dieser Stamm vermittelt aber nur partiellen Schutz. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Impfung einen Schutz gegen die disseminierte Tuberkulose im Kindesalter bietet. Die Wirksamkeit der BCG-Impfung bei Erwachsenen ist sehr variabel und reicht von zufriedenstellend (>80% Schutz) bis wirkungslos bei pulmonaler Tuberkulose. Eine Vielzahl von Faktoren sind als mögliche Ursachen des schwankenden Impfschutzes diskutiert worden; z.B. Abhängigkeit vom verwendeten Impfstamm, oder die umweltbedingte Exposition nicht-tuberkulöser Mykobakterien (Fine, 1995). Es ist daher notwendig Impfstoffe zu entwickeln, die einen zuverlässigeren Schutz bieten.

## 1.2 Die Gattung *Mycobacterium*

Mykobakterien gehören zur Ordnung *Actinomycetales* und Familie *Mycobacteriaceae*. Sie sind mit den Corynebakterien und Norcardien verwandt. Die Mitglieder des Genus *Mycobacterium* sind Gram-positive, sporenlose, unbewegliche Stäbchen mit einer Grösse von 1 bis 10 µm. Die Zellwand von Mykobakterien enthält Mykolsäuren, welche ihnen die charakteristische Säurefestigkeit verleihen (Brennan, 2003). Unter Säurefestigkeit versteht man, dass eine Entfernung der nach Anfärbung mit Anilinfarbstoffen gebildeten

Farbkomplexe mit einem Säure-Alkoholgemisch nicht möglich ist. Mykobakterien können deshalb mit speziellen Färbemethoden, welche diese Säurefestigkeit der Zellwand nutzen (Ziehl-Neelsen, Auramin), selektiv sichtbar gemacht werden.

Mykobakterien können in pathogene und nicht-pathogene Spezies unterteilt werden. Die Mehrheit der über 120 Arten der Gattung *Mycobacterium* sind jedoch nicht-pathogene Mykobakterien (Tortoli, 2006). Nur wenige sind als hoch pathogen anzusehen, so z. B. *M. tuberculosis*, *M. leprae* und *M. ulcerans*. Man unterscheidet vier Hauptgruppen des Genus *Mycobacterium*: 1. *Mycobacterium tuberculosis* Komplex mit *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. caprae* und dem Impfstamm *M. bovis* BCG (Bacille Calmette-Guérin) (Brosch *et al.*, 2002); 2. *Mycobacterium leprae*; 3. *Mycobacterium ulcerans*; 4. NTM (*non-tuberculous mycobacteria*) mit u.a. *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. avium* Komplex und *M. smegmatis* (Katoch, 2004).

**Tabelle 1-1 Medizinisch bedeutsame Spezies von Mykobakterien und die von ihnen verursachten Erkrankungen**

Spezies	Erkrankung
<i>M. tuberculosis</i>	Lungentuberkulose
<i>M. bovis</i>	Rindertuberkulose
<i>M. leprae</i>	Lepra
<i>M. ulcerans</i>	Buruli Ulcus (Hautgranulom)
<i>M. marinum</i>	Geschwüre der Haut („Schwimmbadgranulome“)
<i>M. avium-intracellulare</i>	Sepsis bei AIDS-Patienten

### 1.3 *Mycobacterium tuberculosis*

Die erstmalige Beschreibung von *Mycobacterium tuberculosis*, dem Erreger der Tuberkulose, erfolgte 1882 durch Robert Koch (1843-1910). Er zeigte mit seinen Arbeiten den ursächlichen Zusammenhang zwischen dem von ihm entdeckten Tuberkelbazillus und der Erkrankung auf. Für die Entdeckung wurde Robert Koch 1905 mit dem Nobelpreis für Medizin geehrt (Grandmann, 2005).

*M. tuberculosis* ist ein intrazellulär-pathogenes Bakterium mit einer Grösse von ca. 3 µm und mit einer Generationszeit von 20-24 h den langsam wachsenden Mykobakterien zuzuordnen. Das komplett sequenzierte Genom von *M. tuberculosis* H37Rv umfasst ~4.4 Mb und kodiert für ca. 4000 Gene. Der GC-Gehalt beträgt 65,5% (Camus *et al.*, 2002; Cole *et al.*, 1998). *M. tuberculosis* findet in Makrophagen das bevorzugte Habitat für intrazelluläres Wachstum. Innerhalb der Makrophagen blockiert *M. tuberculosis* die Phagosomenreifung zum Phagolysosom. Die Bildung von Phagolysosomen ist ein

wichtiger Schritt bei der Abtötung einer Vielzahl von Mikroorganismen in phagozytischen Zellen (Russell *et al.*, 2002).



**Abbildung 1-1 Elektronenmikroskopische Aufnahme von *M. tuberculosis*** Quelle: [www.uct.ac.za/depts/mmi/lsteyn/bacteria.html](http://www.uct.ac.za/depts/mmi/lsteyn/bacteria.html)

## 1.4 *M. bovis* BCG als Modellsystem

Wegen der Ähnlichkeit von *M. bovis* BCG und *M. tuberculosis* (99,9% Genomidentität) (Gordon *et al.*, 2001) kann für physiologische Untersuchungen *M. bovis* BCG als „Modellsystem“ herangezogen werden.

Bacille Calmette-Guérin (BCG) ist ein attenuierter Stamm von *M. bovis*, welches nah verwandt mit *M. tuberculosis* ist. *M. bovis* BCG wurde über einem Zeitraum von 13 Jahren durch *in vitro* Passagierungen des virulenten Stammes generiert (Calmette & Guérin, 1920) und seit 1921 als Impfstamm gegen Tuberkulose verwendet. Genetische Untersuchungen zeigten, dass das Genom von *M. bovis* BCG im Vergleich zu *M. tuberculosis* grössere deletierte Bereiche enthält. Die deletierten Regionen kodieren für mehr als 100 Gene. Eine wichtige Region, die in *M. bovis* BCG nicht mehr vorhanden ist, ist die RD1 (*region of difference*) (Behr *et al.*, 1999). Die deletierte genomische Region (ORFs Rv3871 bis Rv3879c) hat eine Grösse von 10 kb und enthält Gene, die direkt für die Virulenz von *M. tuberculosis* verantwortlich sind, und Gene, die an der Regulation von Virulenzgenen beteiligt sind (Mahairas *et al.*, 1996; Mustafa Abu & Al-Attayah, 2003). Zu dieser genomischen Region gehören z.B. *esat6* und Gene des Sekretionssystems ESX-1 (Brodin *et al.*, 2006).

## 1.5 Aufnahme und intrazelluläres Überleben von *M. tuberculosis* in Makrophagen

*M. tuberculosis* ist ein intrazelluläres Pathogen, welches sich vor allem in Makrophagen vermehrt. Aber auch in anderen Wirtszellen wie z.B. dendritischen Zellen, neutrophile Granulozyten oder Epithelzellen können Mykobakterien überleben (Cosma *et al.*, 2003). Neutrophile Granulozyten scheinen eine wichtige Rolle beim Transport von Mykobakterien in sekundäre lymphatische Organe zu spielen (Abadie *et al.*, 2005). Neben der komplexen, lipidreichen Struktur der Zellwand, durch die das Bakterium innerhalb der Makrophagen geschützt wird, verfügt *M. tuberculosis* über verschiedene andere Mechanismen um der Immunantwort zu entgehen. Die Phagozytose wird durch verschiedene Oberflächen-Rezeptoren (z.B. Komplement-Rezeptoren, Mannoserezeptor, Type A Scavenger-Rezeptor) der Makrophagen vermittelt (Ernst, 1998; Fenton *et al.*, 2005). Der Rezeptortyp, welcher bei der Aufnahme von *M. tuberculosis* in die Makrophagen beteiligt ist, scheint dabei das weitere intrazelluläre Schicksal der Bakterien zu bestimmen (Vergne *et al.*, 2004).

Die meisten Mikroorganismen gelangen nach ihrer Aufnahme in Makrophagen in ein frühes phagosomales Kompartiment, welches durch einen schwach sauren pH-Wert (pH 6) und spezifische Membranmoleküle, z.B. kleine GTPase rab5, den Transferrin-Rezeptor und den Mannoserezeptor charakterisiert ist. Bei der Aufnahme der meisten Partikel reift das frühe Phagosom durch Interaktionen mit Endosomen („kiss and run“-Hypothese) zu einem späten Phagosom mit niedrigem pH-Wert (pH 5,5) heran. Dabei werden charakteristische spät-endozytotische Marker wie rab7, LAMP1/2 (*lysosome-associated membrane glycoprotein*) oder die vakuoläre ATPase (vATPase) erworben. Die vATPase ist ein Enzymkomplex, durch den der pH-Wert im Phagosom weiter abgesenkt wird. Die Ansäuerung stellt einen wichtigen Schritt der Phagosomenreifung dar. Anschliessend erfolgt durch Interaktionen mit anderen Vesikeln die weitere Reifung und die Fusion mit Lysosomen. Lysosomen enthalten zahlreiche saure Hydrolasen, z.B. Cathepsin D, welche zur Abtötung von Mikroorganismen beitragen (Amer & Swanson, 2002; Desjardin, 1995; Tjelle *et al.*, 2000; Vieira *et al.*, 2002).

*M. tuberculosis* verhindert die Phagosomenreifung zum Phagolysosom. Die Phagosomen besitzen auch lange Zeit nach der Aufnahme der Bakterien Markerproteine eines frühen Endosoms, wie z.B. die kleinen GTPasen rab5 und rab11 oder den Transferrin-Rezeptor. Es werden keine oder weniger spät-endozytotischen Markerproteine erworben.

Desweiteren unterbleibt eine Ansäuerung, da das Phagosom scheinbar nicht mit späten Endosomen interagieren kann. Die molekularen Mechanismen mit denen *M. tuberculosis* die Phagosomenreifung verhindert, sind aber weitgehend unbekannt (Duclos & Desjardins, 2000; Russell *et al.*, 2002; Vergne *et al.*, 2004; Vergne *et al.*, 2005).

## **1.6 Virulenzmodelle von *M. tuberculosis***

Um die Virulenz von *M. tuberculosis* zu untersuchen, stehen Zellkultur- und Tier-Modelle zur Verfügung. Die Arbeit mit einem Zellkultur-Modell ist einfacher und Ergebnisse sind schneller sichtbar, jedoch auf frühe Stadien einer Infektion (bis ca. 14 Tage) beschränkt. Tier-Modelle hingegen ermöglichen die Untersuchung aller Infektionsstadien einer Tuberkulose bis hin zum *Exitus letalis* bei Überlebenszeitanalysen (Flynn, 2006; Smith, 2003).

### **1.6.1 Zellkultur-Modelle**

Da *M. tuberculosis* sich vor allem in Makrophagen vermehrt, werden in erster Linie Makrophagen, aber auch dendritische Zellen und neutrophile Granulozyten als *in vitro* Modelle für Virulenzuntersuchungen verwendet (Bermudez & Goodman, 1996; Cosma *et al.*, 2003; Rosen, 2004; Smith, 2003). Die Makrophagen können aus Mäusen (Standardisierte Inzuchtstämme) oder aus dem Menschen stammen und sowohl als primäre Zellkultur wie auch als immortalisierte Zelllinie Anwendung finden. Bei der Verwendung von primären Maus-Makrophagen bei *in vitro* Untersuchungen wird vielfach die *in vivo* Situation einer mykobakteriellen Infektion besser wiedergegeben. Es ist möglich, dass *M. tuberculosis* Mutanten nur im Tier-Modell einen attenuierten Phänotyp zeigen, nicht aber im Makrophagen-Modell. Daher finden bei der Suche nach Virulenzfaktoren von *M. tuberculosis* häufig Zellkultur- und Tier-Modelle gemeinsam Anwendung (Kendall *et al.*, 2004; Smith, 2003).

### **1.6.2 Tier-Modelle**

Es existieren verschiedene Tier-Modelle, um die Pathologie einer *M. tuberculosis* Infektion zu untersuchen. Das Maus-Modell ist unter diesen das meist angewandte *in vivo* Modell; andere Tier-Modelle für Untersuchungen der Tuberkulose sind das Meerschweinchen-, Kaninchen-Infektionsmodell und in jüngerer Zeit auch die Infektion nicht-humaner Primaten (Makaken). Jedes dieser Modelle besitzt jedoch Vor- und Nachteile bedingt durch die Komplexität einer Tuberkulose. So bilden sich z.B. die für eine Tuberkulose typischen Granulome in der Maus weniger charakteristisch aus als im Meerschweinchen, während umgekehrt Meerschweinchen eine aussergewöhnliche Empfindlichkeit für

Tuberkulosebakterien aufweisen, welche die natürliche Resistenz des Menschen nur ungenügend wiedergibt (Flynn, 2006; Gupta & Katoch, 2005; Smith, 2003).

Mittels des Maus-Modells konnten in jüngster Zeit einige *M. tuberculosis* Virulenzdeterminanten identifiziert werden. Attenuierte *M. tuberculosis* Defekt-Mutanten werden in verschiedene Klassen eingeteilt. Diese werden nach ihren Wachstums-eigenschaften im Vergleich zum *M. tuberculosis* Wildtyp charakterisiert. Eine Defekt-Mutante zeigt entweder 1) keine Vermehrung über den Beobachtungszeitraum, (*sgiv*; *severe growth in vivo*); 2) eine Vermehrung, welche im Vergleich zum Wildtyp jedoch geringer ist (*giv*; *growth in vivo*); 3) zunächst eine ähnliche Vermehrungsrate wie der Wildtyp (0-3 Wochen), ist dann aber nicht in der Lage zu persistieren (*per*; *persistence*); 4) die Defekt-Mutante zeigt Wachstumseigenschaften des Wildtyps, weist jedoch im Vergleich eine veränderte Organpathologie auf (*pat*; *pathology*) (Glickman & Jacobs, 2001; Hingley-Wilson *et al.*, 2003).

## **1.7 Virulenzfaktoren von *M. tuberculosis***

Für die Pathogenese bakterieller Krankheitserreger sind verschiedene Virulenzfaktoren z.B. Toxine, Adhäsine, Invasine, Lipasen und Proteasen von Bedeutung (Finlay & Falkow, 1997). Diese „klassischen Virulenzfaktoren“ können jedoch nicht in allen pathogenen Bakterien nachgewiesen werden. Auch in *M. tuberculosis* scheint zumindest ein Teil dieser „klassischen Virulenzfaktoren“ zu fehlen (Desjardin & Schlesinger, 2000). In den letzten Jahren konnten verschiedene Gene identifiziert werden, die zur Pathogenität und Virulenz von *M. tuberculosis* beitragen. Die identifizierten Gene/Proteine können in verschiedene Virulenzgruppen, entsprechend ihrer bekannten oder vorausgesagten Funktion, eingeteilt werden, wie z.B. Sekretionsproteine, z.B. Esat-6/CFP-10 (Berthet *et al.*, 1998; Sorensen *et al.*, 1995), Zelloberflächenkomponenten, OmpA (Raynaud *et al.*, 2002), oder regulatorische Proteine, Sigma A (Gomez *et al.*, 1998; Smith, 2003). Insgesamt sind mehr als 200 Gene für die volle Ausprägung der *M. tuberculosis* Virulenz notwendig (Sasseti & Rubin, 2003).

### **1.7.1 Adenylatcyclasen und deren Produkt cAMP als Virulenzfaktor**

Adenylatcyclasen (AC) sind Enzyme, die den universellen *second messenger* cAMP (zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat) aus ATP synthetisieren. cAMP als Signalmolekül ist an einer Vielzahl regulatorischer Prozesse beteiligt, z.B. als Kofaktor bei der Aminosäurebiosynthese, Kohlenstoffverwertung oder bei der Expression von Virulenzfaktoren (Lory *et al.*, 2004). Bei der Wirt-Pathogen Interaktion können wirtseigene Adenylatcyclasen z. B. durch Toxine zur ständigen Synthese von cAMP stimuliert werden



(CyaA von *Bordetella pertussis* (Guo *et al.*, 2005a)) oder die Toxine selber besitzen Adenylatcyclase Aktivität (Anthrax, Ödemfaktor; *Bacillus anthracis* (Abrami *et al.*, 2005)). Bei *Vibrio vulnificus* ist cAMP an der globalen Genregulation beteiligt (Kim *et al.*, 2005). In *Yersinia enterocolitica* ist eine AC für die Expression von Virulenzgenen notwendig (Petersen & Young, 2002).

### 1.7.1.1 Klassifizierung von Adenylatcyclasen

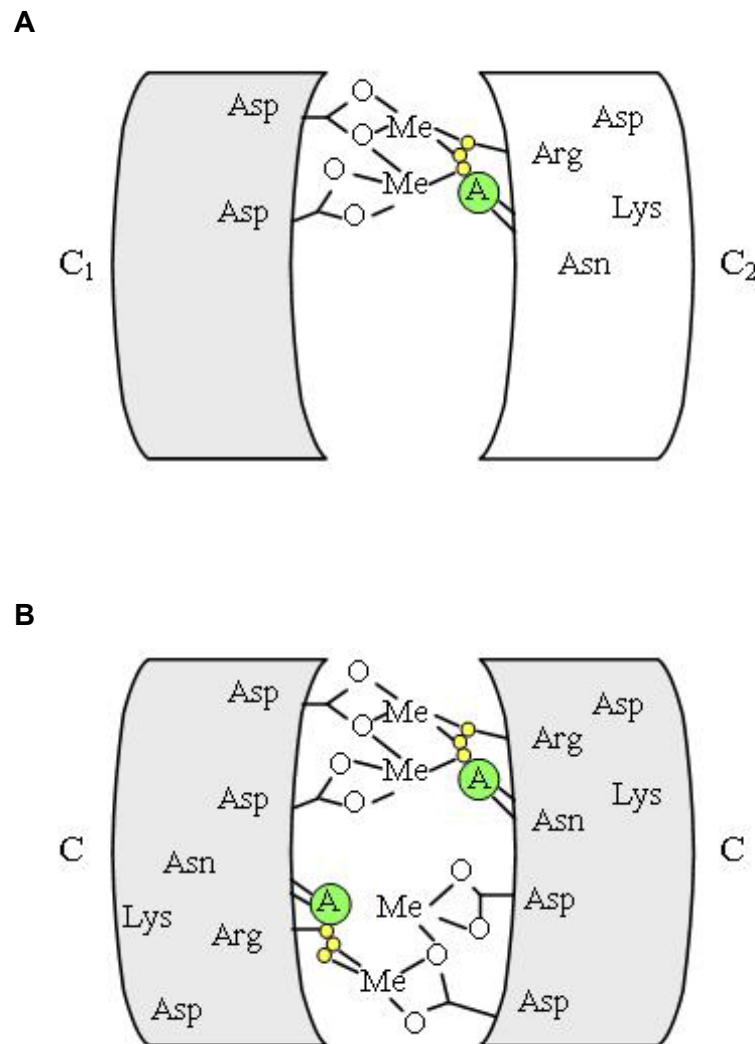
Aufgrund struktureller Eigenschaften werden AC in sechs verschiedene Kategorien (Klasse I-VI) eingeteilt (Barzu & Danchin, 1994; McCue *et al.*, 2000; Tellez-Sosa *et al.*, 2002). Adenylatcyclasen der Klasse I sind in Enterobakterien, wie *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* hoch konserviert. Dort sind sie z.B. an der Katabolit-Repression beteiligt. Intrazelluläres cAMP dient dabei als Aktivator-Molekül. Desweiteren kommen AC der Klasse I z. B. bei *Vibrio cholerae* und *Aeromonas hydrophilia* (CyaA) vor (Baker & Kelly, 2004). Die AC der Klasse II bilden extrazelluläre Toxine, welche von Pathogenen wie z.B. *Bordetella pertussis* (CyaA), *Bacillus anthracis* (Ödemfaktor, EF) oder *Pseudomonas aeruginosa* (ExoY) sezerniert werden. So gelangt beispielsweise das ExoY von *P. aeruginosa* durch das *type III secretion system* (TTSS) (Yahr *et al.*, 1998) in die eukaryotische Zielzelle. Die Toxine werden häufig in der Zielzelle durch zelleigene Kofaktoren, wie z. B. Calmodulin, aktiviert. Dabei werden hohe intrazelluläre cAMP Konzentrationen erreicht (Ahuja *et al.*, 2004; Linder & Schultz, 2003). Klasse III Adenylatcyclasen kommen in Pro- und Eukaryoten vor und werden daher auch als „universelle Klasse“ bezeichnet (Barzu & Danchin, 1994). Die Klasse III AC sind phylogenetisch nah verwandt mit Guanylatcyclasen (GC). Die katalytischen Domänen werden auch als *cyclase homology domains* (CHD) bezeichnet. Ein gemeinsames Merkmal dieser Klasse von Cyclasen sind Sequenzen und Strukturen der katalytischen Untereinheit mit konservierten Aminosäureresten (Baker & Kelly, 2004; Shenoy & Visweswariah, 2004). Die katalytischen Domänen sind oft von regulatorischen Domänen flankiert. Bakterielle Adenylatcyclasen der Klasse III scheinen für die Regulation unterschiedlicher Prozesse (Osmoregulation, Chemotaxis, Phototaxis, pH-Regulation) durch ihre Struktur individuell angepasst zu sein (Linder & Schultz, 2003). Den Klassen IV, V und VI konnte bis jetzt nur je ein Vertreter zugeordnet werden: *Aeromonas hydrophilia* (cyaB) (Sismeiro *et al.*, 1998), *Provatella ruminicola* (Cotta *et al.*, 1998) und *Rhizobium elti* (Baker & Kelly, 2004; Tellez-Sosa *et al.*, 2002);

### 1.7.1.2 Adenylatcyclasen der Klasse III

Die Klasse III Adenylatcyclasen werden in lösliche und membrangebundene AC mit mindestens einer Transmembrandomäne eingeteilt. Sie sind als Dimere aktiv, wobei die Katalyse an der Grenzfläche des Dimers stattfindet. Die in Säugern beschriebenen Prototypen zeichnen sich durch zwei leicht unterschiedliche CHD aus (C1 und C2), welche nach Aktivierung ein Heterodimer mit zwei aktiven Zentren bilden (Baker & Kelly, 2004; Linder & Schultz, 2003; Tang & Hurley, 1998). Es wurden sechs Aminosäuren in AC identifiziert, die bei der Katalyse eine wichtige Funktion einnehmen. Zwei Aspartatreste (Asp) koordinieren zwei Metall-Kofaktoren ( $Mg^{2+}$  oder  $Mn^{2+}$ ), ein Lysin (Lys)-Aspartat (Asp) Paar bindet das ATP und ein Arginin (Arg)-Asparagin (Asp) Paar stabilisiert den Übergangszustand bei der Katalyse. Bei der Bildung von Heterodimeren werden die zwei Aspartatreste von C1 und die anderen benötigten Aminosäurereste von C2 zur Verfügung gestellt. Da C1 und C2 von Säugern eine einzelne Proteinkette bilden, ist nur ein Zentrum katalytisch aktiv und kann das Substrat binden (Abbildung 1-2). Das Prinzip der Katalyse bei den AC ist analog zu dem bei DNA-Polymerasen beschriebenen Mechanismus (Tesmer *et al.*, 1999). Beide Enzyme katalysieren einen nukleophilen Angriff der 3'-OH Gruppe der Ribose am  $\alpha$ -Phosphat des Nukleosid-3-phosphates.

Im Gegensatz zu den AC der Säuger, besitzen die Typ III AC von Bakterien nur eine einzelne CHD, welche als Homodimer wirkt und zwei katalytisch aktive Zentren ausbildet. Die Katalyse findet hier ebenfalls an der Dimergrenzfläche statt. Die für die Katalyse wichtigen Aminosäuren liegen im Gegensatz zu den Säuger-AC in einer CHD (Abbildung 1-2) (Hurley, 1998; Linder, 2006; Linder & Schultz, 2003). Für die Klasse III Adenylatcyclasen wurden die vier Subkategorien IIIa bis IIId definiert. Die Klasse IIIa wurde in *M. tuberculosis* sowie in *Spirulina platensis* entdeckt. Typisches Motiv dieser Klasse ist das (F/Y)XX(F/Y)D Motiv welches an der Dimerbildung beteiligt ist, sowie das EKIK Motiv, welches das Substratbindende Lysin (K) enthält. Der Aminosäureabstand der sogenannten Armregion zwischen einem konservierten Glycin und dem substratbindenden Aspartat beträgt immer 14 Aminosäuren. Diese Subklasse kann sowohl Homo- als auch Heterodimere bilden. Die Klasse IIIb Adenylatcyclasen wurden für Gram-negative als auch für Gram-positive Bakterien beschrieben. Alle Klasse IIIb CHDs bilden Homodimere aus und das substratbindende Aspartat ist durch ein Threonin oder Serin ersetzt. Der Abstand zwischen einem konservierten Glycin und dem substratbindenden Threonin/Serin der Armregion beträgt immer 15 Aminosäuren. Die Subklasse IIIc bildet ebenfalls Homodimere aus und die Armregion ist mit 7 bis 11 Aminosäuren kürzer als jene der Subklassen IIIa und IIIb. Die Klasse IIId wurde bis jetzt

nur in Pilzen beschrieben. Es werden Homodimere gebildet und das substratbindende Lysin (K) ist vom YE**VKT** Motiv umgeben (Linder & Schultz, 2003). Die strukturelle Divergenz der Adenylatcyclasen scheint die Vielfältigkeit der durch den Botenstoff cAMP aktivierten Signaltransduktionsmechanismus zu reflektieren und die Unterschiede in den CHD lassen auf unterschiedliche katalytische Mechanismen schließen (Linder & Schultz, 2003).



**Abbildung 1-2 Dimerstruktur der katalytischen Domäne von Klasse III Adenylatcyclasen**

Die CHD bilden entweder Heterodimere (C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub>) mit einem katalytischen Zentrum (**A**) oder Homodimere (C) mit zwei katalytischen Zentren (**B**). Die Konversion von ATP zu cAMP erfolgt an der Dimer Grenzfläche.

Abkürzungen: A, Adenosin; Me, Metall-Kofaktor; O, Sauerstoffatom; Asp, Aspartat; Asn Asparagin; Arg, Arginin; Lys, Lysin; Phosphatgruppen-gelb. Abbildung verändert nach: (Linder & Schultz, 2003)

### 1.7.1.3 Adenylatcyclasen im Genom von *M. tuberculosis* H37Rv

Das Genom von *M. tuberculosis* H37Rv enthält 15 Gene für Adenylatcyclasen der Klasse III, die den Subklassen IIIa bis IIIc zugeordnet werden können. Zwei der AC von *M. tuberculosis* gehören zur Klasse IIIa, vier zur Klasse IIIb und neun zur Klasse IIIc, siehe Tabelle 1-2 (Cole *et al.*, 1998; Linder & Schultz, 2003; McCue *et al.*, 2000). Diese hohe Anzahl an AC legt die Vermutung nahe, das cAMP zur Pathogenität von *M. tuberculosis* beiträgt, indem es störend auf das eukaryotische Signalsystem wirkt, oder aber die bakterielle Genexpression beeinflusst.

Tabelle 1-2 AC von *M. tuberculosis*

AC von <i>M. tuberculosis</i>	Kasse III	Quelle
Rv0386	c	(Castro <i>et al.</i> , 2005)
Rv0891c	c	uncharakterisiert
<b>Rv1264</b>	c	(Dittrich <i>et al.</i> , 2006; Linder <i>et al.</i> , 2002; Tews <i>et al.</i> , 2005)
Rv1318c	b	(Linder <i>et al.</i> , 2004)
Rv1319c	b	(Linder <i>et al.</i> , 2004)
Rv1320c	b	(Linder <i>et al.</i> , 2004)
Rv1358	c	uncharakterisiert
Rv1359	c	uncharakterisiert
<b>Rv1625c</b>	a	(Guo <i>et al.</i> , 2001; Guo <i>et al.</i> , 2005b)
Rv1647	c	(Shenoy <i>et al.</i> , 2005)
Rv1900c	c	(Sinha <i>et al.</i> , 2005)
Rv2212	c	(Motaal <i>et al.</i> , 2006)
Rv2435c	a	uncharakterisiert
Rv2488c	c	uncharakterisiert
Rv3645	b	(Linder <i>et al.</i> , 2004)

### 1.7.2 Sekretionsproteine als Virulenzfaktoren

Ungefähr 30% des Genoms von *M. tuberculosis* kodiert für sekretierte Proteine. Unter diesen konnte eine Reihe von Virulenzfaktoren nachgewiesen werden z.B. Esat-6/CFP-10, welches in der RD1-Region kodiert ist (Brodin *et al.*, 2004; Mahairas *et al.*, 1996). Sekretierte Proteine können auch mit der Zellwand assoziiert sein, diese Membran- und Oberflächenproteine tragen entscheidend zur Virulenz von *M. tuberculosis* bei (Camacho *et al.*, 2001; Cole *et al.*, 1998). Einige sekretierte Proteine sind Schlüsselantigene bei der protektiven Immunantwort (Young & Garbe, 1991).

Die Sekretion von Proteinen in die extrazelluläre Umgebung ist für Bakterien von entscheidender Bedeutung. Durch diese Proteine ist es pathogenen Bakterien möglich, mit ihrem Wirt in Wechselwirkung zu treten. Es gibt drei Systeme, welche Proteinsekretion über die zytoplasmatische Membran vermitteln, das Sec-System (*secretory*), das SRP-System (*signal-recognition partical*) und das TAT-System (*Twin-arginine-translocation*) (Pallen *et al.*, 2003; Pugsley *et al.*, 2004).

In Gram-negativen Bakterien ist der Sekretionsmechanismus in 5 verschiedene Subklassen unterteilt, die als Typ I bis Typ V bezeichnet werden. Typ I und III sind sec-unabhängige Sekretionssysteme. Die sekretierten Proteine werden dabei direkt vom Zytoplasma in die Umgebung (Typ I) oder in eine Wirtszelle (Typ III) abgegeben. Durch diese Systeme werden z.B. Toxine, Proteasen und Lipasen sekretiert (Pallen *et al.*, 2003; Thanassi & Hultgren, 2000). Sekretionssysteme vom Typ II und IV sind hingegen sec-abhängige Sekretionssysteme. Die sekretierten Proteine werden mit Hilfe der Sec-Maschinerie über die Zytoplasmamembran transloziert, prozessiert und sekretiert. An der Proteintranslokation ist eine Vielzahl von Sec-Proteinen beteiligt, z.B. SecA, SecB, SecEGY und SecD/B. SecA spielt dabei eine wichtige Rolle, da es ein multifunktionales Protein ist. Das Protein besitzt eine ATPase Aktivität, tritt in Wechselwirkung mit dem integralen Membranprotein SecY und bindet an die Signalsequenz der Präproteine (Pugsley *et al.*, 2004). Das Typ II Sekretionssystem ist für die Sekretion von extrazellulären Enzymen und Proteinen verantwortlich. Typ IV ist mit der bakteriellen Konjugationsmaschinerie verwandt. Ähnlich wie Typ III bildet dieses System eine Pilus-ähnliche Struktur, welche beide Membranen durchspannt. Substrate des Typ IV Sekretionsapparates werden direkt in die Wirtszelle injiziert (Abbildung 1-3). Beim Typ V Sekretionssystem (auch als Autotransporter bezeichnet) werden Proteine exportiert, die verschiedene Funktionen erfüllen können. Dazu zählen Proteasen, Toxine, Adhäsine und Invasine. Der Autotransporter benötigt keine zusätzlichen Faktoren. Im Type V

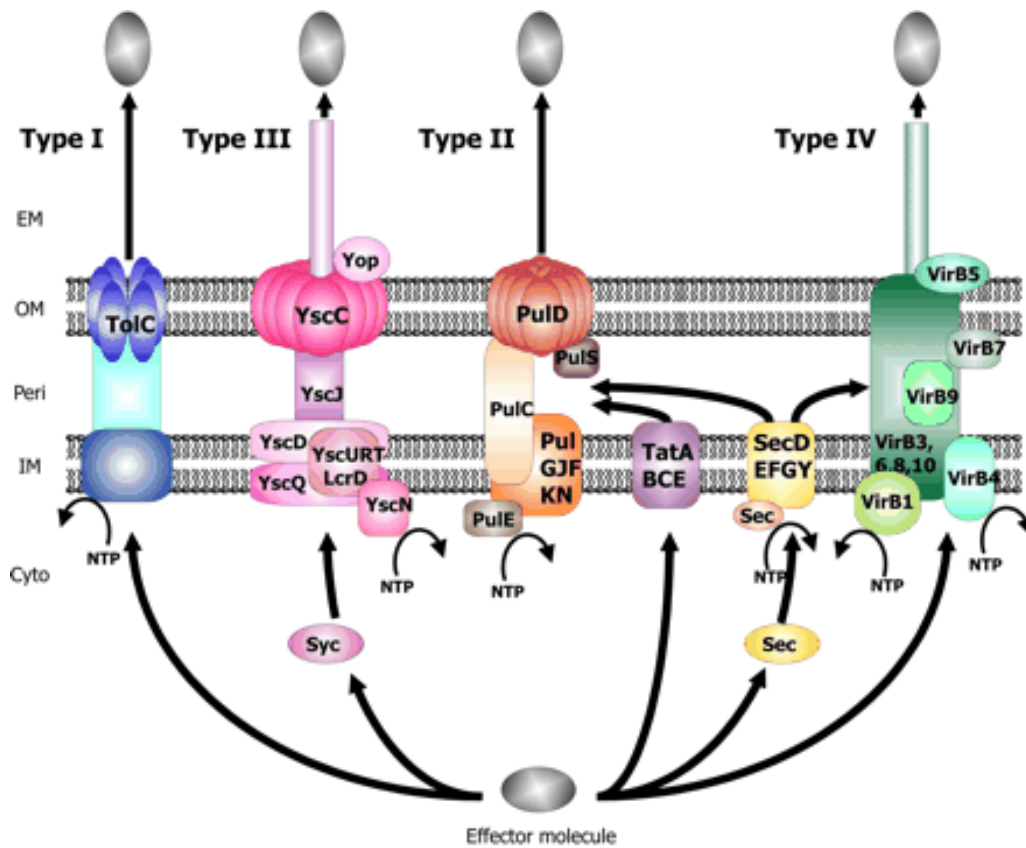
Sekretionssystem werden drei verschiedene Transportmechanismen für Proteine zusammengefasst: das Autotransportersystem ( $V_a$ ), das *two-partner secretions* System (TSP) ( $V_b$ ) und das Type  $V_c$  (Abbildung 1-4) (Henderson *et al.*, 2004; Pallen *et al.*, 2003; Thanassi & Hultgren, 2000).

Im Vergleich zu Gram-negativen Bakterien ist die Proteinsekretion Gram-positiver Bakterien weniger komplex. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Gram-positive und Gram-negative Bakterien ihre Proteine zumindest teilweise über ähnliche Mechanismen sekretieren. Die sekretorischen Proteine werden oft als Präproteine mit spezifischen Signalsequenzen synthetisiert. Diese werden vom Sekretionsapparat erkannt. Der Transport durch die Zytoplasmamembran ist ein ATP-abhängiger Prozess.

Neben den sec-abhängigen Systemen scheint es in Mykobakterien einen von der klassischen Signalsequenz unabhängigen Proteinsekretionsmechanismus zu geben, da Proteine gefunden wurden, welche ohne eine klassische Signalsequenz sekretiert wurden (Bendtsen *et al.*, 2005). So weist beispielsweise die Superoxiddismutase (SodA) von *M. tuberculosis* keine klassische Signalsequenz auf (Raynaud *et al.*, 1998; Sonnenberg & Belisle, 1997), konnte jedoch im Kulturfiltrat von *M. tuberculosis* nachgewiesen werden. Das Protein, welches für die Sekretion des SodA-Proteins, und einiger anderer Proteine von *M. tuberculosis* benötigt wird, wurde nach der Identifikation als SecA2 bezeichnet (Braunstein *et al.*, 2003).

Experimente mit RD1-Mutanten von *M. tuberculosis* zeigen, dass *M. tuberculosis* über einen weiteren Sekretionsmechanismus verfügt (Braunstein *et al.*, 2003; Pym *et al.*, 2003). So wird z.B. das Esat-6-Protein gleichfalls ohne Sec-Signalsequenz in den Kulturüberstand sekretiert. Esat-6 spielt eine entscheidende Rolle in der Virulenz von *M. tuberculosis*. Der Sekretionsmechanismus, über den das Protein über die Zellwand transloziert wird, ist bisher jedoch unbekannt (Brodin *et al.*, 2006; Pym *et al.*, 2003). Das neu entdeckte Sekretionssystem, der Mykobakterien, wurde als Snm (*secretion in mycobacteria*) bezeichnet (Stanley *et al.*, 2003).

Einige pathogene Bakterien besitzen mit dem Typ III- bzw. Typ IV-Sekretionssystem verwandte Sekretionssysteme. Homologe des Typ III- und Typ IV-Sekretionssystems wurden in *M. tuberculosis* nicht identifiziert (Cole *et al.*, 1998).

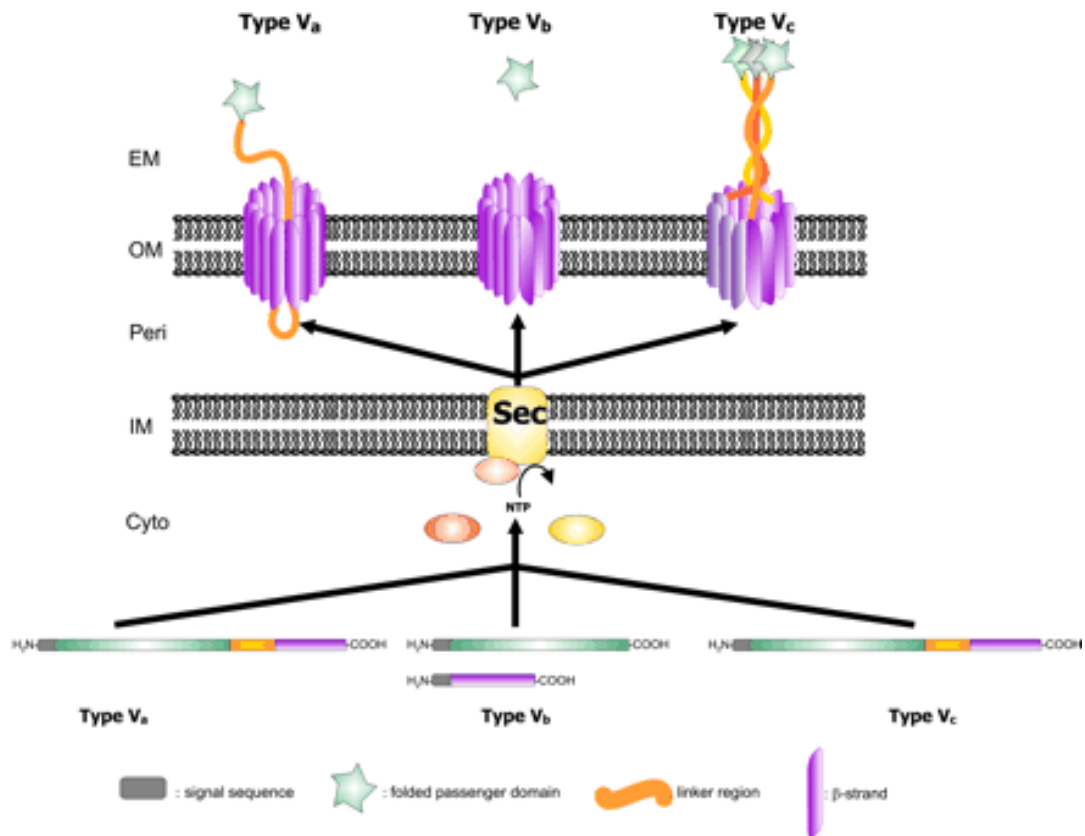


**Abbildung 1-3 Schematische Übersicht der Sekretionssysteme des Typs I bis IV**

Die einzelnen Sekretionssysteme sind beispielhaft erläutert: Typ I durch das Hämolyysin A von *E. coli*; Typ II durch die Sekretion der Pullulanase von *Klebsiella oxytoca*; Typ III durch die Yop Sekretion in *Yersinia* und Typ IV durch das VirB System von *Agrobacterium tumefaciens*. Das Effektormolekül ist grau dargestellt. Das Typ II und auch das Typ IV, nutzen das zytoplasmatische SecB Chaperon. Moleküle, welche über das TAT System exportiert werden, scheinen über das Typ II System sekretiert zu werden. Das Typ III Sekretionssystem beinhaltet ebenfalls zytoplasmatische Chaperone.

Abkürzungen: EM, extrazelluläres Milieu; OM, äussere Membran; Peri, Periplasma; IM, innere Membran; Cyto, Zytoplasma.

Quelle: (Henderson *et al.*, 2004)



#### Abbildung 1-4 Schematische Übersicht des Typ V Sekretionssystems

Die Proteine, welche über den Autotransporter sekretiert werden, werden zunächst mit Hilfe einer Sec-Maschinerie über die zytoplasmatische Membran exportiert. Im periplasmatischen Raum wird die Signalsequenz des Proteins abgespalten und die  $\beta$ -Domäne integriert in die äussere Membran, wobei eine Pore in der Membran gebildet wird. Anschliessend wird die Passengerdomäne eingebracht und durch die äussere Membran transloziert.

Abkürzungen: EM, extrazelluläres Milieu; OM, äussere Membran; Peri, Periplasma; IM, innere Membran; Cyto, Zytoplasma.

Quelle: (Henderson *et al.*, 2004)



### 1.7.3 Die $\beta$ -Untereinheit der $F_0F_1$ -ATP Synthase als Virulenzfaktor

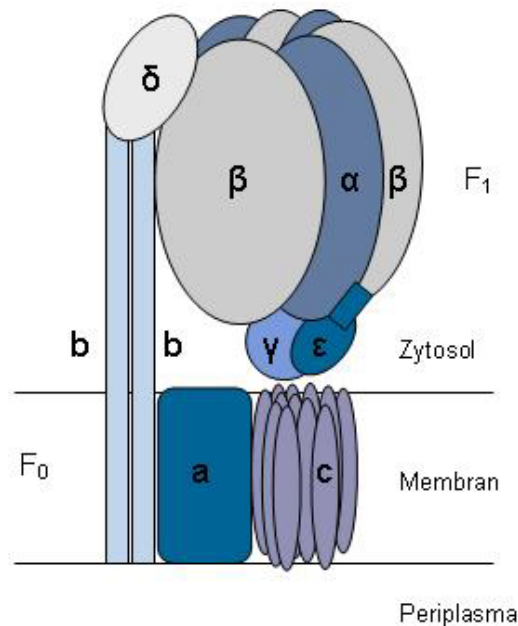
Lebende Organismen sind auf ständige Energiezufuhr angewiesen. Die Energie wird zur Aufrechterhaltung des zellulären Stoffwechsels und der Neusynthese von Makromolekülen verwendet. Der Organismus gewinnt diese Energie aus dem katabolen Stoffwechsel. Sie wird v.a. in Form von Adenosintriphosphat (ATP), dem universellen Träger freier Energie, übertragen.

Die bedeutendsten Reaktionen der ATP-Generierung bei Bakterien sind die oxidative Phosphorylierung und die Substratkettenphosphorylierung. Bei der oxidativen Phosphorylierung wird Energie durch die Übertragung von Elektronen von NADH bzw.  $FADH_2$  auf Sauerstoff gewonnen. Die Elektronen durchfließen verschiedene membranäre Enzymkomplexe der Elektronentransportkette, die für den Transfer von Protonen aus dem Zytoplasma über die Zytoplasmamembran sorgen. Dabei entsteht ein Protonengradient. Beim Ausgleich dieses Gradienten strömen die Protonen durch einen Protonenkanal der  $F_0F_1$ -ATPase, welche die protonenmotorische Kraft zur Bildung von ATP aus ADP und  $P_i$  benutzt.

Die  $F_0F_1$ -ATPase, ein großer Enzymkomplex, wurde bei einer Vielzahl von Bakterien in der Plasmamembran, aber auch in eukaryotischen Organellen (Mitochondrien und Chloroplasten) gefunden (Abrahams *et al.*, 1994; Futai & Kanazawa, 1983; Futai *et al.*, 1989). Abhängig vom jeweiligen Organismus und den Wachstumsbedingungen kann der Enzymkomplex sowohl ATP-Synthese oder die ATP-Hydrolyse katalysieren. Durch ATP-Hydrolyse können Protonen entgegen dem elektrochemischen Gradienten gepumpt werden (Futai & Kanazawa, 1983; Futai *et al.*, 1989).

Von Bakterien wie *E. coli* und *M. tuberculosis* über Pflanzen bis hin zu Säugern ist die  $F_0F_1$ -ATPase eines der am höchsten konservierten Enzyme. In der ATPase ist die katalytische  $\beta$ -Untereinheit mit >60% der Aminosäurereste konserviert (Yoshida *et al.*, 2001).

Die  $F_0F_1$ -ATPase ist in zwei unterschiedliche Domänen unterteilt: die membranäre, hydrophobe Domäne ( $F_0$ -Domäne) und die synthetisierende Domäne ( $F_1$ -Domäne). Die  $F_0$ -Domäne ist aus mindestens 3 Untereinheiten (a, b, c) aufgebaut. Diese bilden den Protonenkanal, der für den Protonenfluss durch die Zytoplasmamembran verantwortlich ist. Die  $F_1$ -Domäne ist nicht-kovalent an  $F_0$  gebunden und kann leicht von diesen gelöst werden. Die  $F_1$ -Domäne enthält das katalytische Zentrum zur ATP-Synthese und besteht aus 5 Polypeptidketten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) in einem stöchiometrischen Verhältnis von 3:3:1:1:1.



**Abbildung 1-5 Darstellung der Struktur eines  $F_0F_1$ -ATPase-Komplexes aus *E. coli***

Die  $F_0$ -Domäne ist membranverankert und bildet den Protonenkanal, bestehend aus den Untereinheiten a, b, c. Die  $F_1$ -Domäne enthält das katalytische Zentrum für die ATP-Synthese und besteht aus 5 Untereinheiten mit der Stöchiometrie ( $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ ). Quelle: [svik.life.smu.edu/images/atpsynth/schemat.html](http://svik.life.smu.edu/images/atpsynth/schemat.html)

Die Sequenzen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit sind verwandt und enthalten beide eine nukleotid-bindende Sequenz für ADP und ATP. Das konservierte nukleotid-bindende Motiv der  $\beta$ -Kette, GXXXXGKT, hat katalytische Funktion bei der ATP-Synthese. In der  $\alpha$ -Kette wirkt es hingegen regulatorisch (Futai & Kanazawa, 1983; Futai *et al.*, 1989). Untersuchungen von Abrahams an bovinen mitochondrialen ATPasen zeigen, dass beide Untereinheiten einen Zylinder um die  $\gamma$ -Untereinheit des  $F_1$  bilden. Durch Rotation des Zylinders um die  $\gamma$ -Untereinheit kommt es zur Bildung von ATP (Abrahams *et al.*, 1994; Senior *et al.*, 2002).

### 1.7.3.1 Die $\beta$ -Untereinheit der $F_0F_1$ -ATP Synthase von *M. tuberculosis*

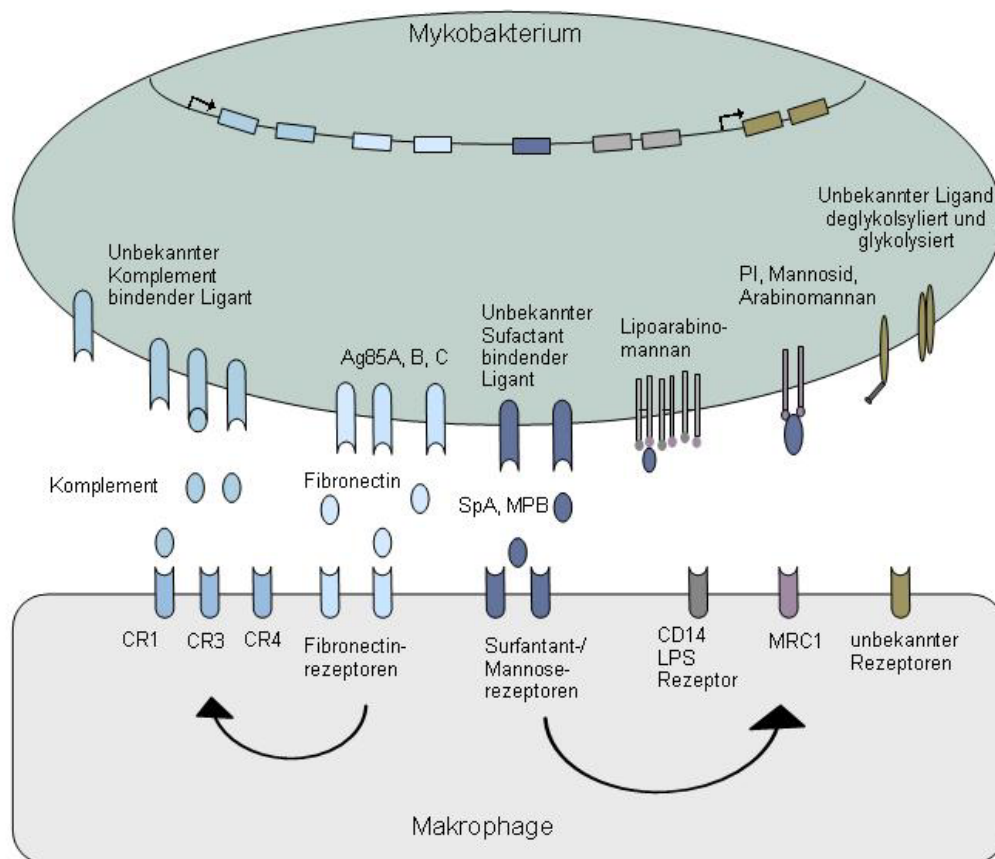
Im mykobakteriellen Operon *atpBEFHAGDC* wird die  $\beta$ -Polypeptidkette der  $F_0F_1$ -ATPase durch das 1458 bp grosse *atpD*-Gen (Rv1310) kodiert (Cole *et al.*, 1998). Die  $\beta$ -Untereinheit besteht aus 486 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ca. 53 kD. In einer Studie wurde das mykobakterielle Protein AtpD im Zytoplasma von Makrophagen, welche mit *M. tuberculosis* infiziert waren, nachgewiesen. Die Untersuchungen zeigten weiterhin, dass es sich bei dem mykobakterielle AtpD um ein Protein handelt, dass nach einer Infektion von Markophagen mit *M. tuberculosis* stärker exprimiert wird (Ragno *et al.*, 2001). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die *atpD* Expression nach der Phagozytose, und der damit verbundenen Änderung des intrazellulären pH-Wertes, induziert wurde und das AtpD in die Wirtszelle sekretiert wird.

#### 1.7.4 Oberflächen-assoziierte Proteine als Virulenzfaktoren

Für viele Pathogene sind Adhäsionsfaktoren wichtige Virulenzdeterminanten. In enteropathogenen *Yersinia* Spezies wird beispielsweise das afimbrische Adhäsın YadA, welches die Adhäsion zu Komponenten der extrazellulären Matrix vermittelt, exprimiert (Heise & Dersch, 2006). In *Bordetella pertussis* ist ein Adhäsın, das filamentöse Hämagglutinin, FHA, für die Anbindung an pulmonale und tracheale Epithelzellen aber auch Makrophagen verantwortlich (Alonso *et al.*, 2002).

Die mykobakterielle Zellwand weist eine sehr komplexe Struktur auf und enthält u.a. zahlreiche Proteine, Lipide (z.B. Mykolsäuren/Mykoside) und Glykolipide (z.B. LAM, Lipoarabino-mannan). Die Physiologie von *M. tuberculosis* ist direkt mit der komplexen Zellwand verknüpft. Die lipid- und glycanreiche äussere Schicht, kann daher als Virulenzfaktor angesehen werden (Glickman & Jacobs, 2001; Smith, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass die glycanreiche äussere Schicht der Zellwand von *M. tuberculosis* einen inhibierenden Einfluss auf die Phagozytose hat. Sie behindert die Assoziation von Bakterium und Makrophage. Es ist naheliegend, dass Oberflächenproteine bei der initialen Interaktion mit der Wirtszelle eine wichtige Rolle spielen. Es ist jedoch kaum bekannt, welche Komponenten der Zelloberflächen tatsächlich die Bindung an Makrophagen vermitteln (Stokes *et al.*, 2004). Makrophagen besitzen eine große Anzahl verschiedener Rezeptoren, die für die Aufnahme unterschiedlicher Partikel verantwortlich sind. Daher existieren viele unterschiedliche Wege, über die ein Bakterium aufgenommen werden kann. Die Aufnahmemechanismen und deren Auswirkungen auf das intrazelluläre Schicksal von Mykobakterien sind jedoch noch weitestgehend unklar (El-Etr & Cirillo, 2001; Fenton *et al.*, 2005).

Die rezeptorvermittelte Phagozytose scheint der meist verbreitete Aufnahmemechanismus von *M. tuberculosis* durch verschiedene eukaryotische Zellen zu sein. Dabei sind unterschiedliche Zellrezeptoren an der Interaktion zwischen Bakterium und Wirtszelle beteiligt wie z. B. die Komplementrezeptoren (CR) 1, 3 und 4, der Surfactantproteinrezeptor oder der Mannoserezeptor (Bermudez & Sangari, 2001; El-Etr & Cirillo, 2001; Ernst, 1998; Raja, 2004). Diese Rezeptoren binden *non-opsonized M. tuberculosis* oder Opsonine an der Oberfläche des Bakteriums. Von besonderer Bedeutung bei der Phagozytose von Mykobakterien scheint CR3 zu sein (Rooyackers & Stokes, 2005; Velasco-Velazquez *et al.*, 2003). Über die dazugehörigen Liganden, welche die Aufnahme von Seiten des Bakteriums begünstigen, ist jedoch sehr wenig bekannt.



**Abbildung 1-6 Darstellung möglicher Aufnahmemechanismen von *M. tuberculosis* in die Wirtszelle**

Die dargestellte Abbildung zeigt bakterielle Liganden, Opsonine und mögliche Wirtszellrezeptoren von Mykobakterien. Wahrscheinlich wirkt eine Vielzahl dieser Faktoren bei der Aufnahme von Mykobakterien zusammen. Die Pfeile im Makrophagen symbolisieren Wechselwirkungen von Rezeptoren durch Aktivierung eines zweiten Rezeptors. Die Pfeile im Mykobakterium stellen Regulons dar, welche an der Aufnahme des Bakteriums beteiligt sind.

**Abkürzungen:** CR, Komplement-Rezeptor; SpA, Surfactant Protein A; C1q, Komplement component 1q; C1qR, C1q Rezeptor; 210KDa, uncharakterisiertes 210Kda Protein; MPB, Mannose-bindendes Protein; Ag85A, B, C, Antigen 85A, 85B und 85C, LPS, Lipopolysaccharide; MRC1, Mannoserezeptor. Verändert nach (El-Etr & Cirillo, 2001)

#### 1.7.4.1 Heparin-bindendes Hämagglutinin Adhäsin (HbhA) von *M. tuberculosis* als Virulenzfaktor

HbhA ist ein 28 kD Glykoprotein, welches nur an der Zelloberfläche von Bakterien des *M. tuberculosis* Komplex sowie bei *M. leprae* und *M. avium*, jedoch nicht bei apathogenen Mykobakterien, exprimiert wird. HbhA ist als ein wichtiges Adhäsion für Epithelzellen beschrieben (Menozzi *et al.*, 1998; Menozzi *et al.*, 1996). Mit Hilfe seiner Lysin-, Alanin-, und Prolin-reichen C-Terminalen Domäne interagiert das Protein mit den Glykosaminoglykanen Heparin und Heparansulfat der Wirtszelle. HbhA wird durch Methylierungen der Lysinreste im C-Terminus post-translational modifiziert (Petthe *et al.*, 2000; Petthe *et al.*, 2002). Diese Methylierungen verleihen HbhA Schutz vor Proteolyse (Petthe *et al.*, 2002).

## 1.8 Ziel der Arbeit

Die Tuberkulose, eine Erkrankung verursacht durch *Mycobacterium tuberculosis*, gilt heute wieder als eine der häufigsten Todesursachen durch Infektionskrankheiten nach HIV Infektionen. Es ist jedoch nur wenig über die bakteriellen Virulenzfaktoren und Mechanismen bekannt, welche es diesem Humanpathogen ermöglichen intrazellulär zu überleben und sich zu vermehren. Die klassischen Virulenzfaktoren wie beispielsweise Toxine scheinen *M. tuberculosis* zu fehlen (Desjardin & Schlesinger, 2000).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung verschiedener Gene/Proteine, welche potentiell zur Pathogenität von *M. tuberculosis* beitragen. Die Gene/Proteine präsentieren drei verschiedenen Virulenzgruppen – regulatorische Prozesse (Adenylatcyclasen Rv1264, Cya), Sekretionsproteine (AtpD), Zelloberflächenkomponenten (HbhA).

Die Charakterisierung dieser Gene als mögliche Virulenzfaktoren erfolgt durch:

- Generierung von Adenylatcyclasen Knockout Mutanten (Rv1264, Cya)
- Generierung einer AtpD Knockout Mutante
- Generierung einer HbhA Knockout Mutante
- Generierung von Überexpressionsmutanten essentieller Gene
- Charakterisierung der Knockout- und Überexpressions Mutanten in *in vitro* und *in vivo* Infektionsmodellen

## 2 Material

Alle nicht näher erläuterten molekularen und biochemischen Standardmethoden sowie Lösungen und Puffer, wurden nach (Ausubel *et al.*, 2006; Sambrook *et al.*, 1989) unverändert durchgeführt.

### 2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben von folgenden Firmen in p.A.-Qualität bezogen: Biorad, Difco, Fluka, Merck, Roth, Sigma.

### 2.2 Enzyme, Grössenstandards, Kits, Membranen

Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, Amersham, Pharmacia
Shrimp alkaline phosphatase	Roche
<i>pfu</i> -DNA-polymerase	Promega
T4-DNA-Ligase	Roche
$\lambda$ -DNA/ <i>Hind</i> III Fragmente	Sigma
Accutase™	Sigma
EDTA-Tryptase	Sigma
Heparin	Sigma
DIG-High Prime	Roche
CDP-Star	Roche
Lysozym	Roche
Proteinase K	Roche
GeneRuler™ 1kb DNA ladder	MBI Fermentas
Protein Standard unstained 161-0362	Biorad
DNA Längenstandards II/III, Digoxigenin-markiert	Roche
Gene Clean Kit	BIO 101
QIAquick PCR Purifications Kit	Qiagen GmbH
Wizard® Plus Midipreps DNA-Purification Systeme	Promega
Nylon Membran, positiv geladen	Roche
Immun-Blot™ PVDF Membran	Biorad

## 2.3 Geräte

Elektroporations-Apparat: GenePulser Xcell™	Biorad
PCR: Tpersonal	Biometra
DNA-Sequenzierer: ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
DNA Elektrophorese-Apparat: (Wide) Mini-Sub® Cell GT	Biorad
SDS-PAGE-Apparat: Mini Protean II system / Criterion	Biorad
Blot-Apparat: Mini Trans Blot®	Biorad
DNA Blotting Apparatur	Biometra
Hybridisierungssofen	Biometra
Photometer: GeneQuant™ pro RNA/DNA calculator	Amersham Biosciences
Zentrifugen:	
Biofuge pico	Heraeus
Biofuge fresco	Heraeus
Multifuge 4KR	Sorvall Heraeus
RC24 (Rotor SS-34)	Sorvall
Sterilbank	Skan
Pipetten:	Eppendorf, Socorex
Rollflaschen-System	Corning
CO <sub>2</sub> Inkubatoren	Heraeus
UV-Stratalinker 2400	Stratagene

## 2.4 Nährmedien

### 2.4.1 Nährmedien für Bakterienkulturen

Alle Medien für Flüssigkulturen (Bakterien) wurden bei 120°C 20 min autoklaviert und nach dem Abkühlen der Lösungen auf 40°C-50°C wurden die entsprechenden Zusätze zugesetzt.

LB-Medium:	0,5% (w/v) Hefe-Extrakt
	1% (w/v) Bacto-Trypton
	1% (w/v) NaCl;
LB Agarplatten:	LB-Medium
	1,5% (w/v) Bacto-Agar

Middlebrook 7H9: 0,47% (w/v) Middlebrook,  
0,2% (v/v) Glycerol  
0,05% (v/v) Tween  
Middlebrook OADC Anreicherung (BBL)

Middlebrook 7H10: Middlebrook 7H10 Agar  
0,4% (v/v) Glycerol  
Middlebrook OADC Anreicherung (BBL)

## 2.4.2 Nährmedien für Zellkultur

DMEM + FCS: 90% DMEM  
10% (v/v) hitzeinaktiviertes FCS

DMEM + FCS + P/S: 89% DMEM (Gibco)  
10% (v/v) hitzeinaktiviertes FCS  
1% (v/v) Penicillin/Streptomycin

BMDM-Medium: 79% DMEM (Gibco)  
10% (v/v) hitzeinaktiviertes FCS  
10% (v/v) LCCM  
1% (v/v) Penicillin/Streptomycin

LCCM: 50% LCCM 1 (Kulturmedium von L-929,  
1. Woche)  
50% LCCM 2 (Kulturmedium von L-929,  
2. Woche)

Gefrierzell-Medium: 70% DMEM  
20% hitzeinaktiviertes FCS  
10% DMSO



## 2.5 Zusätze für Nährmedien und Agarplatten

Ampicillin	100 µg/ml in H <sub>2</sub> O
Chloramphenicol	10 µg/ml in Ethanol
Kanamycin	50 µg/ml in H <sub>2</sub> O
Hygromycin	50 µg/ml in H <sub>2</sub> O
Streptomycin	100 µg/ml in H <sub>2</sub> O
IPTG	100 mM in H <sub>2</sub> O
FCS	10% (v/v)
Penicillin/Streptomycin	1% (v/v)
LCCM	10% (v/v)

## 2.6 Puffer und Lösungen

### 10x TE-Puffer

100 mM Tris/HCl pH 7,5  
10 mM EDTA pH 7,5

### EB-Puffer

10 mM Tris/HCl pH 8,5

### PBS, pH 7,4

220 mM NaCl  
150 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
130 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

### SDS

10% SDS (w/v)

### 50 x TAE

2 M Tris  
57,1 ml Essigsäure  
10% 0,5 M EDTA, pH 8 (v/v)

### DNA-Probenpuffer mit RNase

Stock: 10 mg/ml	10 min aufkochen
Für den Probenpuffer:	20 µg/ml

### DNA-Probenpuffer

15% Ficoll Typ400  
0,25% Bromphenolblau/Xylenecyanol

### 2.6.1 Puffer für Mini-Präparation

#### Puffer I

Tris/HCl, pH 7,5	25 mM
EDTA pH 8,0	10 mM
Glukose	50 mM

#### Puffer II

NaOH	0,2 N
SDS	1%

#### Puffer III

Natriumacetat pH 4,8	3 M
----------------------	-----

### 2.6.2 Southern Blot-Lösungen

HCl-Lösung:	0,25 M HCl
Denaturierungslösung:	1,5 M NaCl
	0,5 M NaOH
Neutralisierungslösung pH 7,5:	0,5 M Tris Base
	3 M NaCl
20x SSC pH 7,0:	3 M NaCl
	0,3 M Natrium-Citrat
2x SSC:	10% 20xSSC (v/v)
2x SSC/0,1% SDS:	10% 20xSSC (v/v)
	0,1% SDS (v/v)
0,1x SSC/0,1 % SDS:	0,5% 20xSSC (v/v)
Waschpuffer:	0,1 M Maleinsäure
	0,15 M NaCl
	0,3% (v/v) Tween 20
Maleinsäurepuffer pH 7,5:	0,1 M Maleinsäure
	0,15 M NaCl
Detektionspuffer pH 9,5:	0,1 M NaCl
	2 M Tris Base

Hybridisierungslösung:	0,05 M SDS 50% Formamid (v/v) 25% 20x SSC (v/v) 5% 1 M NaPO <sub>4</sub> pH 7,0 (v/v) 0,003 M N-lauroylsarcosine 20% (v/v) 10x Blockinglösung
10x Blockinglösung:	10% (w/v) Blockinglösung in Maleinsäurepuffer
Blockingreagenz:	10% (v/v) Blockinglösung 90% (v/v) Maleinsäurepuffer

### **Stripping-Puffer**

0,2 M NaOH  
0,1% (v/v) SDS

### **Natriumphosphat-Puffer, pH 7,0 Southern Blot**

39% Lösung A; 1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
61% Lösung B; 1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

### **2.6.3 Western Blot-Lösungen**

Laufpuffer:	250 mM Tris Base 1% SDS (v/v) 14,4% Glycerin (v/v)
10 x TBS pH 7,5 :	0,5 M Tris Base 1,5 M NaCl
1 x TBST:	10% TBS (v/v) mit 0,05 % Tween20
Blocking-Lösung:	4% Magermilch in TBST

### **Natriumphosphatpuffer für Proteine**

10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
10% SDS (v/v)

## 2.7 DNA-Sonden

Tabelle 2-1 Übersicht der verwendeten DNA-Sonden

DNA-Sonde	Generierung	Bindestelle
Rv1264-Sonde	Restriktion von pBS-Rv1264 mit <i>Bam</i> HI; Fragment: 0,6 kb	5'Ende Rv1264
Deletions-Sonde Rv1264	Restriktion von pBS-Rv1264 mit <i>Sna</i> BI/ <i>Bsu</i> 36I, Fragment: 0,9 kb	Rv1264
<i>cya</i> -Sonde	Restriktion von pBacyA-rpsL mit <i>Nco</i> I; Fragment: 2,1 kb	3'Ende <i>cya</i>
Deletions-Sonde <i>cya</i>	Restriktion von pBacyA-rpsL mit <i>Esp</i> II; Fragment: 0,6 kb	<i>cya</i>
<i>hbhA</i> -Sonde	Restriktion von pBS-hbhA mit <i>Bam</i> HI; Fragment: 1 kb	5'Ende <i>hbhA</i>
Hygromycin-Sonde	Restriktion von pIJ963 mit <i>Bgl</i> II; Fragment: 1,8 kb	hyg-Kassette
Kanamycin-Sonde	Restriktion von pUC4K mit <i>Eco</i> RI; Fragment: 1,2 kb	aph-Kassette

## 2.8 Antikörper

Tabelle 2-2 Übersicht der verwendeten Antikörper

Antikörper	Spenderorganismus	Verdünnung	Hersteller/Quelle
Anti-HA (Klon 12CA5)-HRP	Maus	1:300	Roche
Anti-Digoxigenin-AP	Schaf	1:100	Roche
Anti-HbhA	Kaninchen	1:2000	(Pethe <i>et al.</i> , 2001b)
Anti-Maus-HRP	Ziege	1:10.000	Biorad
Anti-Kanichem-HRP	Ziege	1:10.000	Biorad

## 2.9 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Microsynth aus Balgach/Schweiz synthetisiert.

Berechnung der Schmelztemperatur ( $T_m$ ):

$$T_m = 69,3^{\circ}\text{C} + 0,41 * (\text{G} + \text{C})\% - 650/\text{nt}$$

Berechnung der Anlagerungstemperatur ( $T_a$ ):

$$T_a = (T_m + T_{m2})/2 - 3^{\circ}\text{C}$$

## 2.9.1 Oligonukleotide für die PCR

Tabelle 2-3 Übersicht der verwendeten PCR-Primer

Nummer	Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Bindestelle
I	19kDaProfwrHpaEco	GGG TTA ACG AAT TCT ACA TTG CCA CTA CTA CGG TGC	19kD Fragment
II	19kDaProatpHAreV	CTT TTC GGC AGT GGT AGT CAC CCT GTG CTC CTT TGC	19kD Fragment
III	19kDaProatpHAfrw	GCA AA GAG CAC AGG GTG ACT ACC ACT GCC GAA AAG ACC	19kD Fragment
IV	ProatpHAreVHpaEco	CCG TTA ACG AAT TCT CAG GCG TAG TCG GGG ACG TCG TAC AGC TTG GCG CCG AGA CTC	atpD Fragement
V	19kDaProHAatprev	GGC GTA GTC GGG GAC GTC GTA CAC CCT GTG CTC CTT TGC	19kD Fragment
VI	19kDaProHAatpfrw	GTG TAC GAC GTC CCC GAC TAC GCC ACT ACC ACT GCC GAA AAG ACC	19kD Fragment
VII	ProHAatprevHpaEco	CCG TTA ACG AAT TCT CAC AGC TTG GCG CCG AGA CTC TC	atpD Fragement
VIII	fbpBProfwrHpaEco	GGG TTA ACG AAT TCA ACC TCC GAT GCC CTC AGC	fbpB85 Fragement
IX	fbpBProatpHAreV	CGG TCT TTT CGG CAG TGG TAG TCA TAC TTG TGC CCC TTT GTC C	fbpB85 Fragement
X	fbpBProatpHAfrw	GGA CAA AGG GGC ACA AGT ATG ACT ACC ACT GCC GAA AAG ACC G	fbpB85 Fragement
XI	fbpBProHAatprev	GGC GTA GTC GGG GAC GTC GTA CAT ACT TGT GCC CCT TTG TCC	fbpB85 Fragement
XII	fbpBProHAatpfrw	ATG TAC GAC GTC CCC GAC TAC GCC ACT ACC ACT GCC GAA AAG ACC	fbpB85 Fragement

## 2.9.2 Oligonukleotide für Sequenzierungen

Tabelle 2-4 Übersicht der verwendeten Sequenzier-Primer

Nummer	Bezeichnung	Sequenz 5'→ 3'	Bindestelle
<b>A</b>	atpDfow0	ATG ACT ACC ACT GCC AAA AG	<i>atpD</i> Fragment
<b>B</b>	atpDrev0	CTT TTC GGC AGT GGT AGT CAT	<i>atpD</i> Fragment
<b>C</b>	atpDfow1	GTT TCC TCG CGG TTC CAT C	<i>atpD</i> Fragment
<b>D</b>	atpDfow2	CTG GGA GAT TGC CTG GAC	<i>atpD</i> Fragment
<b>E</b>	atpDfow3	GTA CGT CGG TGT TCG CCG	<i>atpD</i> Fragment
<b>F</b>	atpDfow4	GTT CAC CCA GGC TGG GTC	<i>atpD</i> Fragment
<b>G</b>	atpDfow5	CTC CAA GGG CAT CTT CCC	<i>atpD</i> Fragment
<b>I</b>	atpDfow6	GAA CAG TTC ACC GGC CAG	<i>atpD</i> Fragment
<b>J</b>	T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	pMCS5-Vektor-Primer
<b>K</b>	T122	GTT TTC CCA GTC ACG ACG	pMCS5-Vektor-Primer
<b>L</b>	T7-Promotor	TAA TAC GAC TCA CTA	pBuescript T7-Promotor
<b>M</b>	T3-Promotor	ATT ACC CCT CAC TAA AG	pBuescript T3-Promotor
<b>N</b>	#83 reverse	GTT TCC CGT TGA ATA TGG CTC	aph Fragment
<b>P</b>	SP6-Promotor	ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA	pGEMT-easy SP6-Promotor

## 2.10 Bakterienstämme

Die Kultivierung von *M. tuberculosis* Stämmen unmittelbar vor den Versuchen erfolgte in einem Rollflaschen System (Corning) bei 37°C und 2 rpm. Ansonsten wurden die Mykobakterien in Zellkulturflaschen bei 37°C gezüchtet.

Tabelle 2-5 Übersicht der verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Eigenschaften	Quelle
<i>E. coli</i> DH5α	Wirtstamm für die Konstruktion von rekombinanten Plasmiden; <i>lacZ</i> -negativ	MBI Fermentas
<i>E. coli</i> , BL21-CodonPlus®(DE3)-RP	<i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> ompT hsdS(r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) dcm <sup>+</sup> Tet <sup>r</sup> gal λ (DE3) endA Hte[argU proL Cam <sup>r</sup> ]	Stratagene
<i>M. bovis</i> BCG	# 1721 SmR (RpsL, 42 Lys→Arg)	(Sander <i>et al.</i> , unpubliziert)
<i>M. tuberculosis</i>	# 1424 SmR (RpsL, 42 Lys→Arg) Derivat von H37Rv (ATCC)	(Raynaud <i>et al.</i> , 2002)

### *M. tuberculosis* Knockout Stämme Rv1264

<i>M. tuberculosis</i> Rv1264 sco	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv mit Rv1264Δ::hyg und Rv1264	diese Arbeit
<i>M. tuberculosis</i> Rv1264Δ	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv mit Rv1264Δ::hyg	diese Arbeit
<i>M. tuberculosis</i> Rv1264Δ Komplementation	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv mit Rv1264Δ::hyg und Rv1264	diese Arbeit

### *M. tuberculosis* Knockout Stämme *cya*

<i>M. tuberculosis</i> <i>cya</i> sco	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv mit <i>cya</i> Δ::aph und Rv1625c	diese Arbeit
<i>M. tuberculosis</i> <i>cya</i> Δ	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv mit <i>cya</i> Δ::aph	diese Arbeit

***M. tuberculosis* Knockout Stämme Rv1264/*cya***

<i>M. tuberculosis</i> Rv1264Δ/ <i>cya</i> sco	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv mit Rv1264Δ::hyg, <i>cya</i> Δ::aph und Rv1625c	diese Arbeit
<i>M. tuberculosis</i> Rv1264Δ/ <i>cya</i> Δ	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv mit Rv1264Δ::hyg/ <i>cya</i> ::aph	diese Arbeit

***M. tuberculosis* Knockout Stämme *hbhA***

<i>M. tuberculosis</i> <i>hbhA</i> sco	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv mit <i>hbhA</i> ::aph Gen und <i>hbhA</i>	diese Arbeit
<i>M. tuberculosis</i> <i>hbhA</i> Δ	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv mit <i>hbhA</i> ::aph	diese Arbeit
<i>M. tuberculosis</i> <i>hbhA</i> Δ Komplementation	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv mit <i>hbhA</i> ::aph und <i>hbhA</i>	diese Arbeit

***M. tuberculosis* Knockout Stamm *atpD***

<i>M. tuberculosis</i> <i>atpD</i> sco	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv mit <i>atpD</i> ::aph und <i>atpD</i>	diese Arbeit
--	--	--------------

## 2.11 Plasmide

Tabelle 2-6 Übersicht der verwendeten bakteriellen Plasmide

Bezeichnung	Vektor	Eigenschaft	Insert	Quelle
pBluescript KSII+	Klonierungsvektor	Amp <sup>R</sup> ,		Stratagene
pUC4K	Klonierungsvektor	Amp <sup>R</sup> , Aph <sup>R</sup>		LKB
pIJ963	Klonierungsvektor	Aph <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>		Pharmacia (Lydiat et al., 1989)
pMV361-hyg	mykobakterieller, integrativer Shuttle-Vektor	Aph <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>		(Sander et al., 1997)



Material				
ptrpA-1-rpsL	Suizid-Vektor auf Basis des pBluescript KSII+	Amp <sup>R</sup> , Sm <sup>S</sup>		(Sander <i>et al.</i> , 2001)
pOLYG	mykobakterieller, replikativer Shuttle-Vektor	Hyg <sup>R</sup>		(Garbe <i>et al.</i> , 1994)
pGEMT-easy	AT-Klonierungsvektor	Amp <sup>R</sup>		Promega
pET-15b	Expressionsvektor	Amp <sup>R</sup>		Novagen
pMCS5	Klonierungsvektor	Amp <sup>R</sup>		MoBiTec

#### BAC Klone

BAC-Rv230	pBeloBAC11	Chl <sup>R</sup>	Genombereich <i>M. tuberculosis</i> H37Rv (Positionen: 1.336.764 bis 1.411.979 bp)	(Brosch <i>et al.</i> , 1998)
BAC-Rv407	pBeloBAC11	Chl <sup>R</sup>	Genombereich <i>M. tuberculosis</i> H37Rv (Positionen: 1.411.979 bis 1.464.436 bp)	(Brosch <i>et al.</i> , 1998)
BAC-Rv417	pBeloBAC11	Chl <sup>R</sup>	Genombereich <i>M. tuberculosis</i> H37Rv (Positionen: 1.755.770 bis 1.830.362 bp)	(Brosch <i>et al.</i> , 1998)
BAC-Rv265	pBeloBAC11	Chl <sup>R</sup>	Genombereich <i>M. tuberculosis</i> H37Rv (Positionen: 513.402 bis 599.515 bp)	(Brosch <i>et al.</i> , 1998)

---

**Deletion und Komplementation von *M. tuberculosis* Rv1264**


---

pBS+Rv1264_upstream	Suizid-Vektor auf Basis des pBluescript KSII+	Amp <sup>R</sup>	Genombereich <i>M. tuberculosis</i> H37Rv (1.409.425 bis 1.411.982 bp)	diese Arbeit
pBS+Rv1264_downstream	Suizid-Vektor auf Basis des pBluescript KSII+	Amp <sup>R</sup>	Genombereich <i>M. tuberculosis</i> H37Rv (1.411.982 bis 1.416.123 bp)	diese Arbeit
pBS+Rv1264	Suizid-Vektor auf Basis des pBluescript KSII+	Amp <sup>R</sup>	Genombereich <i>M. tuberculosis</i> H37Rv (1.409.425 bis 1.416.123 bp)	diese Arbeit
ptrpA-1-rpsL+Rv1264Δ	Suizid-Vektor auf Basis des pBluescript KSII+	Amp <sup>R</sup> , Sm <sup>S</sup>	Deletion in Rv 1264 in <i>M. tuberculosis</i> H37Rv (1.412.092 bis 1.412.979 bp)	diese Arbeit
ptrpA-1- rpsL+Rv1264Δ::hyg	Suizid-Vektor auf Basis des pBluescript KSII+	Amp <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Sm <sup>S</sup>	Deletion in Rv 1264 mit Hyg <sup>R</sup> Insertion (1.411.906 bp) in <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	diese Arbeit

**Deletion von *M. tuberculosis* *cya***


---

pBacA-rpsL	Suizid-Vektor auf Basis des pBluescript KSII+	Amp <sup>R</sup> , Sm <sup>S</sup>	Genombereich <i>M. tuberculosis</i> H37Rv (1.826.614 [Stopp] bis 1.827.945 bp [start])	diese Arbeit
pBacA::aph-rpsL	Suizid-Vektor auf Basis des pBluescript KSII+	Amp <sup>R</sup> , Sm <sup>S</sup> Aph <sup>R</sup>	Deletion in Rv 1625c (1.826.753 bis 1.827.375 bp) mit Aph <sup>R</sup> Insertion in <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	diese Arbeit

### Deletion und Komplementation von *M. tuberculosis* *hbhA*

pBluescript- <i>hbhA</i>	Suizid-Vektor auf Basis des pBluescript KSII+	Amp <sup>R</sup>	Genombereich <i>M. tuberculosis</i> H37Rv (560.775 bis 568.979 bp)	diese Arbeit
pBluescript- <i>hbhA::aph</i>	Suizid-Vektor auf Basis des pBluescript KSII+	Amp <sup>R</sup> , Aph <sup>R</sup>	Deletion in <i>hbhA</i> (565.917 bis 566.105 bp) mit Aph <sup>R</sup> Insertion in <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	diese Arbeit
ptrpA-1-rpsL- <i>hbhA::aph</i>	Suizid-Vektor auf Basis des pBluescript KSII+	Amp <sup>R</sup> , Sm <sup>S</sup> , Aph <sup>R</sup>	Deletion in <i>hbhA</i> (565.917 bis 566.105 bp) mit Aph <sup>R</sup> Insertion in <i>M. tuberculosis</i> H37Rv (564.560 bis 568.979 bp)	diese Arbeit
pOLYG- <i>hbhA</i>	mycobakterieller, replikativer Shuttle-Vektor	Hyg <sup>R</sup>	Genombereich <i>M. tuberculosis</i> H37Rv (565.506 bis 566.441 bp)	diese Arbeit

### Deletion von *M. tuberculosis* *atpD*

pBluescript- <i>atpD</i>	Suizid-Vektor auf Basis des pBluescript KSII+	Amp <sup>R</sup>	Genombereich <i>M. tuberculosis</i> H37Rv (1.463.630 bis 1.469.671 bp)	diese Arbeit
pBluescript- <i>atpD::hyg</i>	Suizid-Vektor auf Basis des pBluescript KSII+	Amp <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	Hyg <sup>R</sup> Insertion in <i>M. tuberculosis</i> H37Rv <i>atpD</i>	diese Arbeit
ptrpA-1-rpsL- <i>atpD::hyg</i>	Suizid-Vektor auf Basis des pBluescript KSII+	Amp <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	Hyg <sup>R</sup> Insertion in <i>M. tuberculosis</i> H37Rv <i>atpD</i>	diese Arbeit

---

**Expression von *atpD***


---

pMCS5- <i>atpD</i> -Ak	Klonierungsvektor	Amp <sup>R</sup>	<i>atpD</i> -Gen	diese Arbeit
pMCS5-P <sub>19kDa</sub> - <i>atpD</i> -HA	Klonierungsvektor	Amp <sup>R</sup>	<i>atpD</i>	diese Arbeit
			Fusionskonstrukt	
pMCS5-P <sub>19kDa</sub> -HA- <i>atpD</i>	Klonierungsvektor	Amp <sup>R</sup>	<i>atpD</i>	diese Arbeit
			Fusionskonstrukt	
pMCS5-P <sub>fbpB85</sub> - <i>atpD</i> -HA	Klonierungsvektor	Amp <sup>R</sup>	<i>atpD</i>	diese Arbeit
			Fusionskonstrukt	
pMCS5-P <sub>fbpB85</sub> -HA- <i>atpD</i>	Klonierungsvektor	Amp <sup>R</sup>	<i>atpD</i>	diese Arbeit
			Fusionskonstrukt	
pMV361-hyg-P <sub>19kDa</sub> - <i>atpD</i> -HA	mykobakterieller, integrativer Shuttle-Vektor	Aph <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	<i>atpD</i>	diese Arbeit
			Fusionskonstrukt	
pMV361-hyg-P <sub>19kDa</sub> -HA- <i>atpD</i>	mykobakterieller, integrativer Shuttle-Vektor	Aph <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	<i>atpD</i>	diese Arbeit
			Fusionskonstrukt	
pMV361-hyg-P <sub>fbpB85</sub> - <i>atpD</i> -HA	mykobakterieller, integrativer Shuttle-Vektor	Aph <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	<i>atpD</i>	diese Arbeit
			Fusionskonstrukt	
pMV361-hyg-P <sub>fbpB85</sub> -HA- <i>atpD</i>	mykobakterieller, integrativer Shuttle-Vektor	Aph <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	<i>atpD</i>	diese Arbeit
			Fusionskonstrukt	
pMV361Δint-hyg-P <sub>19kDa</sub> - <i>atpD</i> -HA	mykobakterieller, integrativer Shuttle-Vektor	Aph <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	<i>atpD</i>	diese Arbeit
			Fusionskonstrukt	
pMV361Δint-hyg-P <sub>19kDa</sub> -HA- <i>atpD</i>	mykobakterieller, integrativer Vektor	Aph <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	<i>atpD</i>	diese Arbeit
			Fusionskonstrukt	
pMV361Δint-hyg-P <sub>fbpB85</sub> - <i>atpD</i> -HA	mykobakterieller, integrativer Shuttle-Vektor	Aph <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	<i>atpD</i>	diese Arbeit
			Fusionskonstrukt	
pMV361Δint-hyg-P <sub>fbpB85</sub> -HA- <i>atpD</i>	mykobakterieller, integrativer Shuttle-Vektor	Aph <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	<i>atpD</i>	diese Arbeit
			Fusionskonstrukt	
pOLYG-P <sub>19kDa</sub> - <i>atpD</i> -HA	mykobakterieller, replikativer Shuttle-Vektor	Hyg <sup>R</sup>	<i>atpD</i>	diese Arbeit
			Fusionskonstrukt	

---

Material				
pOLYG-P <sub>19kDa</sub> -HA- <i>atpD</i>	mykobakterieller, replikativer Shuttle-Vektor	Hyg <sup>R</sup>	<i>atpD</i> Fusionskonstrukt	diese Arbeit
pOLYG-P <sub>fbpB85</sub> - <i>atpD</i> -HA	mykobakterieller, replikativer Shuttle-Vektor	Hyg <sup>R</sup>	<i>atpD</i> Fusionskonstrukt	diese Arbeit
pOLYG-P <sub>fbpB85</sub> -HA- <i>atpD</i>	mykobakterieller, replikativer Shuttle-Vektor	Hyg <sup>R</sup>	<i>atpD</i> Fusionskonstrukt	diese Arbeit

## 2.12 Zelllinien und primäre Zellen

Tabelle 2-7 Übersicht der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp
J-774	murine Monozyten-Makrophagen
A-549	humane Lungenepithelkarzinomzellen
L-929	murine Bindegewebsfibroblasten

Tabelle 2-8 Primäre Zellen

Primäre Zellen	Spenderorganismus-Maus
BMDM	C57BL/6J (♀)

## 2.13 Mausstämme

Tabelle 2-9 Mausstämme

Stamm	Zucht
C57BL/6 (♀)	Inzuchtstamm (J) 150

## 3 Methoden

Alle Arbeiten mit *M. tuberculosis* erfolgten in einem Sicherheitslabor der Stufe 3.

### 3.1 Mikrobiologische Methoden

#### 3.1.1 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in LB-Medium für 14-20 h bei 200 rpm (37°C) in Erlenmeyer-Kolben oder auf LB-Agarplatten für 14-20 h (37°C). Zu den Selektiv-Medien wurden gegebenenfalls 100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin oder 50 µg/ml Hygromycin zugesetzt. Alle Bakterienstämme wurden bei -80°C in LB-Medium mit einer finalen Glycerolkonzentration von 15% gelagert.

#### 3.1.2 Kultivierung von *M. tuberculosis*

Die Kultivierung von *M. tuberculosis* erfolgte in Middlebrook 7H9 OADC-Medium bei 37°C in liegenden Zellkulturflaschen oder in einem Zellroller System bei 37°C und 2 rpm. Für die 4-wöchige Anzucht auf Platten (37°C) wurde ein Middlebrook-Medium 7H10 OADC verwendet. Die Medien für transformierte Mykobakterien enthielten Antibiotika, 50 µg/ml Kanamycin bzw. 50 µg/ml Hygromycin. Alle Bakterienstämme wurden bei -80°C in 7H9-Medium mit 10%igem Glycerol, oder in 0,9% NaCl gelagert.

#### 3.1.3 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation

##### 3.1.3.1 Calciumchlorid-kompetente *E. coli* DH5α

49 ml LB-Medium wurden mit 1 ml Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,52 bis 0,69 im Schüttler bei 37°C inkubiert. Die Kultur wurde 10 min bei 4.400 rpm (4°C) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschliessend in 12,5 ml kalter, steriler 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung gewaschen. Nach der Zentrifugation (10 min bei 4.400 rpm, 4°C) wurden die Zellen in 1,25 ml kalter, steriler 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung aufgenommen und für mindestens 1 h auf Eis inkubiert. Zuletzt wurden die kompetenten Zellen in 520 µl 86%igem Glycerol resuspendiert, in Eppendorf-Reaktionsgefäße zu je 200 µl aliquotiert und bei -80°C bis zum Gebrauch gelagert.

Für die Transformation wurde ein Aliquot kompetenter Zellen mit DNA gemischt und 30-45 min auf Eis inkubiert. Anschliessend erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 90 Sekunden. Nach Inkubation auf Eis (5 min) wurden die Zellen in 1 ml LB-Medium

resuspendiert und für 1 h bei 200 rpm (37°C) im Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **3.1.3.2 Elektrokompetente *M. tuberculosis***

*M. tuberculosis* wurde in Middlebrook 7H9-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,7-1,0 kultiviert und mit 0,1 Volumen 2 M Glycin induziert. Nach 20-24 h wurden die Zellen für 20 min bei 4.400 rpm (RT) zentrifugiert und 4x mit 10%igem Glycerol gewaschen. Das Zellpellet wurde in 4-8 ml 10%igem Glycerol aufgenommen.

Für die Transformation wurden 400 µl kompetente Zellen mit 1 µg DNA gemischt, für 30 min bei RT inkubiert und in 2 mm-Küvetten bei U= 2,5 kV, R= 1 kΩ, C= 25 µF für 15-25 ms transformiert. Die transformierten Zellen wurden in 4 ml Middlebrook 7H9-Medium aufgenommen und für 20-24 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden auf antibiotikahaltigen 7H10-Agarplatten über einen Zeitraum von 3-6 Wochen bei 37°C inkubiert.

### **3.1.3.3 Bestimmung der Zelldichte**

Als Mass für die Zelldichte einer Bakterienkultur diente ihre optische Dichte (OD). Diese wurde in einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Bei einer OD = 1 wurde eine geschätzten Zellzahl von ungefähr 10<sup>9</sup> Zellen pro ml angenommen.

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Amplifizierung von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde zur Amplifizierung von Genabschnitten für die anschließende Fusions-PCR verwendet. Dazu wurde der folgende Ansatz angewandt:

100-300 ng	DNA
30 pmol	Forward-Primer
30 pmol	Reverse- Primer
5 µl	10x Puffer
2 mM	dNTP-Mix (10mM)
1-2 U	<i>Pfu</i> -Polymerase
ad. 50 µl	destilliertes H <sub>2</sub> O

Die Bedingungen für die PCR wurden nach Angaben des Herstellers (Promega) gewählt. Die Annealing-Temperatur wurde je nach Schmelztemperatur des Primer-Paares verändert.

Standard-PCR-Bedingungen:

1 Zyklus	Initiale Denaturierung:	96°C	5 min
30 Zyklen	Denaturierung:	96°C	20 sek
	Annealing:	50-60°C	2 min
	Elongation :	72°C	0,5 kb/min
1 Zyklus	Finale Elongation :	72°C	10 min

### 3.2.2 Fusions-PCR

Für die Generierung der verschiedenen Fusionskonstrukte wurde eine Fusions-PCR durchgeführt. Hierzu wurden zunächst die DNA-Teilfragmente mittels PCR (3.2.1.) erzeugt. Die Teilfragmente besitzen komplementäre 3'- bzw. 5'- Enden, die durch Primer eingefügt wurden. Die Teilfragmente wurden in 1:1-, 1:2- und 2:1-Verhältnissen, mit den endständigen Primern in einem 50 µl-Ansatz (3.2.1.) gemischt. Die annealten (gepaarten)



Einzelstränge wurden zu Doppelsträngen aufgefüllt (5 Zyklen) und anschliessend unter folgenden PCR-Parametern in ihrer vollen Länge amplifiziert (25 Zyklen):

1 Zyklus	Initiale Denaturierung:	96°C	5 min
5 Zyklen	Denaturierung:	96°C	20 sek
	Annealing:	55°C	2 min
	Elongation:	72°C	0,5 kb/min
25 Zyklen	Denaturierung:	96°C	20 sek
	Annealing:	60°C	2 min
	Elongation:	72°C	0,5 kb/ min
1 Zyklus	Finale Elongation:	72°C	10 min

### **3.2.3 Methoden der Plasmid-DNA-Isolierung**

#### **3.2.3.1 Plasmid-DNA-Isolierung im kleinen Massstab**

Aus 5 ml einer LB-Übernachtskultur mit dem entsprechenden Antibiotikum wurden 1,5 ml 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 150 µl Puffer 1 resuspendiert und mit 150 µl Puffer 2 für maximal 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl Puffer 3 wurde die Lösung für 10 min auf Eis inkubiert und anschliessend 15 min bei 13.000 rpm (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 0,7 Vol. 100% Isopropanol präzipitiert, für 5 min auf Eis inkubiert und 15 min bei 13.000 rpm (4°C) zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 70%igem, kaltem Ethanol gewaschen, 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, luftgetrocknet und in 30-50 µl EB-Puffer gelöst. Die Plasmid-DNA wurde bei -20°C gelagert.

#### **3.2.3.2 Plasmid-DNA-Isolierung im mittleren Massstab nach Promega**

Ausgehend von einer 100 ml Übernachtskultur in LB wurde die Bakteriensuspension 15 min bei 4.400 rpm (4°C) zentrifugiert. Die Gewinnung der Plasmid-DNA im mittleren Massstab wurde unter Verwendung des Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System, Promega durchgeführt. Für nähere Informationen siehe Promega-Handbuch 09/02.

### **3.2.4 Isolierung genomischer DNA aus Mykobakterien**

Für die Isolierung genomischer DNA aus Mykobakterien wurden Bakterien einer bewachsenen Agarplatte verwendet. Dazu wurde ein Teil der Bakterien von der Platte abgekratzt und in 340 µl TE-Puffer resuspendiert. Anschliessend erfolgte die Hitzeinaktivierung der Bakterien für 20 min bei 80°C. Danach wurden 4 µl 10% Tween und 0,8 mg Lysozym zu den Bakterien gegeben. Nach einer Inkubation von 2 h bei 37°C unter leichtem schütteln wurden 20 µl 20% SDS und 20 µl Proteinase K (2 mg/ml) dazugegeben und für 1 h bei 50°C bei leichtem schütteln inkubiert. Anschliessend wurde 1 Vol. eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) Gemisches zu den lysierten Bakterien gegeben und geschüttelt. Das Ausschütteln des Gemisches erfolgte für mindestens 1h bei RT in einem Thermomixer mit einer Geschwindigkeit von 1400 rpm. Nach dem Ausschütteln wurde für 30 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und die obere wässrige Phase abgenommen. Die Präzipitation der genomischen DNA erfolgte durch Zugabe von 1/50 Vol. 5 M NaCl und 2,5 Vol. 100% Ethanol und anschliessender Inkubation über Nacht bei -20°C. Nach der Präzipitation wurde bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert und das DNA-Pellet mit 70%igen kalten Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen des DNA-Pellets wurde dies in einem entsprechenden Volumen EB-Puffer gelöst.

### **3.2.5 Ethanolpräzipitation von DNA**

Die Reinigung bzw. Konzentrierung der Plasmid-DNA und DNA-Fragmente erfolgte mit Ethanol. Die DNA-Lösung wurde mit 1/10 Vol 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Vol kaltem 100%igem Ethanol versetzt und für 1 h bei -80°C gefällt. Die DNA wurde 20 min bei 13.000 rpm (4°C) zentrifugiert und anschliessend mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde luftgetrocknet und in einer entsprechenden Menge Wasser gelöst.

### **3.2.6 Konzentrationsbestimmung von DNA**

Die Konzentration von DNA wurde spektralphotometrisch anhand der Absorption bei 260 nm bestimmt. Der Reinheitsgrad der Präparation wurde durch den Quotienten  $A_{260}/A_{280}$ , der zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte, ermittelt.

Für Ligationen wurde die DNA-Konzentration nach Agarosegelelektrophorese abgeschätzt.

### **3.2.7 Restriktion von DNA**

Die für die Restriktion eingesetzte Enzymmenge richtete sich nach der zu spaltenden DNA-Menge, wobei laut Definition eine Unit (U) des Enzyms in der Lage ist, bei optimalen Puffer- und Temperaturbedingungen 1 µg spezifische DNA in einer Stunde vollständig zu

spalten. Um die Enzymaktivität durch das im Enzym-Aufbewahrungspuffer enthaltene Glycerin nicht zu beeinflussen, sollte die Enzymmenge 1/10 des Reaktionsvolumens nicht überschreiten. Der jeweilige 10x Restriktionspuffer richtete sich nach den verwendeten Enzymen und ist einer vom Hersteller mitgelieferten Tabelle zu entnehmen. Bei Restriktion mit mehreren Enzymen, die unterschiedliche Restriktionspuffer benötigen, empfahl sich die Verwendung eines 10 x Universal Puffers (Stratagene). Der Restriktionsansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

0,5-2 µg DNA

10x Puffer

Enzyme

H<sub>2</sub>O

Das Wasser wurde dabei bis zur benötigten Pufferkonzentration aufgefüllt. Üblicherweise hatten die Spaltansätze ein Endvolumen von 20 µl und enthielten 0,5-1,0 µg DNA. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte bei 37°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen DNA-Probenpuffer gestoppt, und die entstandenen Fragmente wurden im Agarosegel aufgetrennt. Die Länge der Inkubationszeit und die Menge an eingesetztem Enzym (in Units) richteten sich nach der Molarität der zu spaltenden DNA.

### **3.2.8 Dephosphorylierung linearisierter DNA**

Zu einem Restriktionsansatz wurden 1-2 Units der Shrimp alkalischen Phosphatase (SAP, Roche) und 10x Dephosphorylierungs-Puffer gegeben. Der Ansatz wird bei „blunt-ended“ DNA-Fragmenten 1 h, sonst 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde bei 75°C für 10 min die SAP hitzeinaktiviert und gegebenenfalls über den „QIAquick PCR Aufreinigung Kit“ von QIAGEN (3.2.13) aufgereinigt.

### **3.2.9 Entfernen von Überhängen von linearisierter DNA**

Das Abstumpfen der linearisierten DNA erfolgte mit der T4 DNA-Polymerase. Dazu wurde die linearisierte DNA mit 1-2 Units T4 DNA Polymerase, 2 mM dNTPs und 5x T4-Inkubationspuffer behandelt. Die Inkubation erfolgte für 15 min bei 37°C mit anschließender Inaktivierung der T4 DNA Polymerase bei 75°C für 10 min. Das behandelte DNA-Fragment wurde anschliessend über den „QIAquick PCR Aufreinigung Kit“ von QIAGEN (3.2.13) aufgereinigt.

### **3.2.10 Ligation von DNA-Fragmenten**

Die zu ligierenden DNA-Fragmente sollten in einem molaren Verhältnis von 1:1 bis 1:5 vorliegen (z.B. 30 fmol Vektor und 150 fmol Insert). Daneben wurden 10x Ligasepuffer (z.B. von Fermentas, Endkonzentration 1x Ligasepuffer), 1 µl T4-DNA-Ligase und Wasser

bis zum gewünschten Endvolumen zugesetzt. Dabei ist zu beachten, dass dieses Volumen möglichst gering ist. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurden ca. 10 µl für eine Transformation eingesetzt. Der Rest wurde bei -20°C aufbewahrt.

### **3.2.11 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren**

Lineare DNA-Fragmente von etwa 0,4-20 kb wurden in Agarosegelen aufgetrennt, deren Agarosekonzentration je nach Fragmentgröße zwischen 0,3% und mehr als 2% lag. Mit einem 1%igen Agarosegel erhält man eine optimale Auftrennung für Moleküle einer Größe von 0,5-10 kb. Als Laufpuffer wurde 1 x TAE eingesetzt. Zur Herstellung eines Gels wurde die Agarose im Laufpuffer aufgeköcht, bis sie vollständig gelöst war. Nach dem Abkühlen auf etwa 50°C wurde die Lösung luftblasenfrei in einen Gelschlitten mit eingesetztem Kamm gegossen. Die DNA-Probenen wurden mit 1/6 Volumen Probenpuffer vermischt und die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 90 V-120 V durchgeführt. Bei einer Elektrophorese über Nacht wurde die Spannung auf 30 V reguliert. Die Blaufont des Probenpuffers (Xylenxyanol/Bromphenolblau) läuft auf einer Höhe von ca. 3 kb und 500 bp. Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung wurde eine Färbung mit Ethidiumbromid durchgeführt, um die DNA durch UV-Bestrahlung sichtbar zu machen und photographisch zu dokumentieren.

### **3.2.12 Extraktion von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel**

Zur Extraktion der DNA aus Agarosegelen wurde das QIAquick Gel Extraktion Kit von QIAGEN bzw. der „Gene Clean Kit“ BIO 101 Systems, Q BIOgene verwendet. Für nähere Informationen siehe QIAGEN-Handbuch, Gel Extraktion Kit 1996-2002 bzw. Q BIOgene #1001-999-1G05. Nach der Extraktion wurden Ausbeute und Sauberkeit des Fragments durch Agarosegelelektrophorese bestimmt.

### **3.2.13 Aufreinigung von PCR-Produkten**

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurde das „QIAquick PCR Aufreinigung Kit“ von QIAGEN verwendet. Für nähere Informationen siehe QIAGEN-Handbuch, QIAquick PCR Aufreinigungs Kit 1996-2002.

### **3.2.14 Sequenzierung von DNA**

Für Sequenzierungen wurde das ABI Dye Terminator Cycle Sequencing Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Menge an Template-DNA betrug bei Plasmiden 500-1000 ng und bei PCR-Produkten 10 ng pro 50 bp. Die Sonden der Sequenzier-PCR wurden über PERFORMA® DTR Gel Filtration Säulen gereinigt (Protokoll siehe

Hersteller). Die anschliessende Sequenzierung wurde in einem ABI Prism 310 Sequenzierer (Applied Biosystems) durchgeführt und mit der Software ABI Prism 10 (Version 3.4.1.) analysiert.

### **3.2.15 Southern Blot**

#### **3.2.15.1 Herstellung von DNA-Sonden**

Die nichtradioaktive Markierung der durch PCR oder Restriktionsverdau gewonnenen DNA wurde mit DIG-High Prime nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Markierung der DNA erfolgte mit Digoxigenin-11-dUTP. Nähere Angaben sind dem mitgelieferten Protokoll zu entnehmen, 1 585 06, Roche.

#### **3.2.15.2 Southern Blot Analyse**

Für die Southern Blot Analyse der über Nacht gespaltenen genomischen DNA (~0.5–1 µg) wurde diese in einem 1,2% Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wurde dann je 15 min bei RT in der HCl, Denaturierungs- und Neutralisierungslösung inkubiert. Anschliessend erfolgten eine Äquilibration des Agarosegels in 2 x SSC für 30 min bei RT und der DNA-Transfer auf eine Nylonmembran mittels einer Vakuum-Blottingapparatur für 90 min bei 500 – 600 mbar. Dabei wurde das Agarosegel mit 20 x SSC überschichtet und mit 2 x SSC umspült. Die Bindung der DNA an die Nylonmembran erfolgte durch UV-Vernetzung (Stratalinker). Die Nylonmembran wurde dann für 1 h bei 42°C mit der Hybridisierungslösung präinkubiert und über Nacht mit einer DNA-Sonde in Hybridisierungslösung inkubiert.

Für die Detektion wurde die hybridisierte Membran 2 x 5 min bei 42°C mit 2 x SSC/0.1%SDS und 2 x 15 min bei 68°C mit vorgewärmten 0,1 x SSC/0,1%SDS gewaschen. Nach kurzer Äquilibration im Waschpuffer wurde die Membran für 30 min bei RT mit Blockingreagenz abgesättigt und mit Anti-Digoxigenin-AP Antikörper in Blockingreagenz für weitere 30 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran 2 x 15 min bei RT mit Waschpuffer gewaschen und für 3 min bei RT im Detektionspuffer äquilibriert. Für die Detektion wurde CDP-Star verwendet und für die Entwicklung des exponierten Filmes eine Fotoentwicklungsmaschine der Firma Kodak eingesetzt.

#### **3.2.15.3 Strippen von Southern Blots**

Die Digoxigenin-11-dUTP Sonde ist alkali-labil und kann daher effizient von DNA-Sonden entfernt werden, eine Rehybridisierung einer Membran ist so möglich.

Die Membran wurde zunächst in reichlich Wasser gespült und anschliessend 2 x 15 min bei RT mit Stripping-Puffer gewaschen. Die Membran wurde dann für 5 min bei RT mit 2 x SSC gespült, bevor sie erneut mit einer DNA-Sonde hybridisiert wurde.

### **3.2.16 Inaktivierung von *M. tuberculosis* Genen**

Für die Inaktivierung der zu untersuchenden Gene von *M. tuberculosis* wurde die Methode der Homologen Rekombination gewählt. Dabei wurde *rpsL*<sup>+</sup> als negativ dominanter Selektionsmarker verwendet (Sander *et al.*, 2001) und ein Suizidvektor konstruiert, welcher das zu zerstörende Gen und dessen flankierende Regionen enthielt.

#### **3.2.16.1 Inaktivierung von Rv1264**

Das Gen Rv1264 [1.411.894 bis 1.413.087 bp; <http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>] von *M. tuberculosis* und dessen flankierenden Regionen [1.409.423 bis 1.416.125 bp] wurden in zwei Schritten durch Restriktion der BAC Klone 230 und 407 gewonnen. Die *upstream* Region wurde aus BAC 230 mit *Hind*III [1.411.982] sowie *Pst*I [1.409.425] isoliert, die *downstream* Regionen aus BAC 407 mit *Hind*III [1.411.982/1.416.123]. Beide Fragmente (2.557 bp/4.141 bp) wurden zunächst in den Vektor pBluescript KS II<sup>+</sup> (pBS) subkloniert (pBS+Rv1264\_upstream/pBS+Rv1264\_downstream) und anschliessend in pBS+Rv1264 vereinigt. Die Inaktivierung von Rv1264 wurde durch Herausschneiden eines 887 bp grossen Genabschnittes [*Sna*BI/*Bsu*36I: 1.412.092-1.412.979 bp] erreicht. Das entstandene Fragment wurde nun in den Suizidvektor, ptrpA-1-rpsL, durch Restriktion mit *Nco*I [1.409.932/1.414.903 bp] eingebracht, ptrpA-1-rpsL+Rv1264Δ und eine 1,8 kb Hygromycin Resistenzkassette wurde für die spätere Selektion in die *Pml*I [1.411.906] Restriktionsstelle eingefügt. Der entstandene Vektor ptrpA-rpsL+Rv1264Δ::hyg wurde für die Transformation von *M. tuberculosis* H37Rv verwendet. Die Selektion der Transformanten wurde auf 7H10 Hyg und 7H10 Hyg/Sm Agarplatten durchgeführt.

Für die Komplementation von Rv1264Δ wurde in die *Hpa*I Restriktionsstelle des Vektors pMV361-hyg ein 5,0 kb *Nco*I [1409932/1414903] geschnittenes Fragment aus pBS-Rv1264 eingefügt. Die Selektion komplementierter Rv1264Δ Knockout-Stämme (Rv1264<sup>+</sup>) erfolgte auf 7H10 Kanamycin Agarplatten.

#### **3.2.16.2 Inaktivierung von *cya***

Das Gen Rv1625c (*cya*) [1.826.616 bis 1.827.945 bp; <http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>] von *M. tuberculosis* und dessen flankierenden Regionen [1.825.641 bis 1.830.365 bp] wurden durch Restriktion der BAC Klon 417 mit *Sal*I und *Hind*III gewonnen und in den Vektor pBluescript-rpsL kloniert. Die Inaktivierung

von *cya* wurde durch Herausschneiden eines 622 bp grossen Genabschnittes [*Esp3I*: 1.826.753-1.827.375 bp] erreicht und eine 1,2 kb Kanamycin Resistenzkassette für die spätere Selektion eingefügt. Der entstandene Vektor pBcya::aph-rpsL wurde für die Transformation von *M. tuberculosis* H37Rv verwendet. Die Selektion der Transformanten erfolgt auf 7H10 Kan und 7H10 Kan/Sm Agarplatten.

### **3.2.16.3 Inaktivierung von Rv1264 und *cya***

Für die Generierung eines Adenylatcyclasen-Doppelknockout Rv1264Δ/*cya*Δ wurde der bereits generierte *M. tuberculosis* Knockout Rv1264Δ als Ausgangsstamm verwendet. Dieser *M. tuberculosis* Stamm ist gegen Hygromycin resistent und der für die Inaktivierung von *cya*Δ generierte Suizidvektor trägt eine Kanamycin Resistenz. Der vorhandene pBcya::aph-rpsL Vektor konnte für die Transformation von *M. tuberculosis* Knockout Rv1264Δ eingesetzt werden. Die Selektion der erhaltenen Transformanten wurde auf 7H10 Kan und 7H10 Kan/Sm Agarplatten durchgeführt.

### **3.2.16.4 Inaktivierung von *atpD***

Das Gen *atpD* (Rv1310) [1.465.841 bis 1.467.301 bp; <http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>] von *M. tuberculosis* sollte initial durch Homologe Rekombination inaktiviert werden.

Das Gen und dessen flankierenden Regionen [1.463.630 bis 1.469.671 bp] wurden aus dem BAC-Klon 128 durch Restriktion mit *SacI* und *NheI* gewonnen und in den Vektor pBluescript KS II + (ohne *PstI*, Restriktion *XbaI/SacI*) zwischenkloniert, pBS-*atpD*. Die Inaktivierung erfolgte durch Insertion einer Hygromycin Resistenzkassette für die spätere Gegenselektion in die *PstI* Schnittstelle des *atpD*, pBS-*atpD*::*hyg*. Anschliessend erfolgte die Umklonierung von pBS-*atpD*::*hyg* durch Restriktion mit *SacI* und *SpeI* in den Suizidevektor ptrpA-1-rpsL. Der entstandene Vektor ptrpA-1-rpsL-*atpD*::*hyg* wurde für die Transformation von *M. tuberculosis* H37Rv verwendet. Die Selektion der Transformanten wurde auf 7H10 Hyg und 7H10 Hyg/Sm Agarplatten durchgeführt und deren Analyse erfolgte mit der Southern Blot Methode.

### **3.2.16.5 Inaktivierung von *hbhA***

Das Gen *hbhA* (Rv0475) [565.797 bis 566.393 bp; <http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>] von *M. tuberculosis* und dessen flankierenden Regionen [560.775 bis 568.979 bp] wurden durch Restriktion des BAC Klones 265 mit *SalI* und *ClaI* gewonnen und in den Vektor pBluescript SK II kloniert, pBluescript-*hbhA*. Die Inaktivierung von *hbhA* wurde durch Herausschneiden eines 188 bp grossen Genabschnittes [*BsiI/XbaI*: 565.917-566.105 bp] erreicht und eine 1,2 kb Kanamycin Resistenzkassette für die spätere Selektion eingefügt.

Der entstandene Vektor pBluescript-hbhA::aph wurde mit *NotI* (564.560 bp) und *Apal* (Schnittstelle im Vektor) erneut geschnitten und in den Vektor ptrpA-1-rpsL kloniert. Der erhaltende Suizidvektor ptrpA-1-rpsL-hbhA::aph wurde für die Transformation von *M. tuberculosis* H37Rv verwendet. Die Selektion der erhaltenen Transformanten wurde auf 7H10 Kan und 7H10 Kan/Sm Agarplatten durchgeführt.

Für die Komplementation des hbhAΔ Stammes wurde in die *EcoRV* Restriktionsstelle des pOLYG-Vektors ein 0,9 kb *SaI* [565.503 bis 5606.437 bp] geschnittenes Fragment aus pBluescript-hbhA eingefügt. Die Selektion komplementierter *hbhAΔ* Knockout Stämme erfolgte auf 7H10 Hygromycin Agarplatten.

### 3.2.17 Generierung von AtpD-Expressionskonstrukten

#### 3.2.17.1 Generierung von AtpD-Expressionskonstrukten mit N-terminaler Erkennungssequenz

Die erhaltenen PCR-Teilprodukte sowie die Fusionskonstrukte wurden durch Sequenzierung mit den Primern A bis K auf ihre Richtigkeit geprüft.

Die Promotorregion des 19kD-Gens wurde mit den Primern I und V und das Strukturgen *atpD* mit den Primern VI und VII aus genomischer DNA von *M. tuberculosis* amplifiziert. Die beiden erhaltenen Fragmente, P<sub>19kD</sub>-HA und *atpD*-Teilfragment, wurden für die Fusions-PCR mit den Primern I und VII eingesetzt. Das Fusionskonstrukt P<sub>19kD</sub>-HA-*atpD* wurde über die *HpaI*-Restriktionsstelle in den Klonierungsvektor pMCS5 zwischenkloniert. Für die Klonierungen in die mykobakteriellen Shuttle-Vektoren wurde das Fusionskonstrukt über die *HpaI*-Restriktionsstelle aus dem Vektor pMCS5-P<sub>19kD</sub>-HA-*atpD* herausgeschnitten. Die Ligation des replikativen Shuttle-Vektors pOLYG mit dem *HpaI*-verdauten Fusionskonstrukt P<sub>19kD</sub>-HA-*atpD* erfolgte über die *EcoRI*-Restriktionsstelle des Vektors. Das Fusionskonstrukt P<sub>19kD</sub>-HA-*atpD* wurde über die *HpaI*-Restriktionsstelle in die beiden integrativen Shuttle-Vektoren pMV361-hyg und pMV361Δint-hyg kloniert. Die entstandenen Plasmide wurden als pOLYG-P<sub>19kD</sub>-HA-*atpD*, pMV361 -hyg-P<sub>19kD</sub>-HA-*atpD*, pMV361Δint-hyg-P<sub>19kD</sub>-HA-*atpD* bezeichnet.

Bei der Generierung des Fusionskonstrukts P<sub>fbpB85</sub>-HA-*atpD* wurde nach der gleichen Strategie wie für das P<sub>19kDa</sub>-HA-*atpD* verfahren. Das P<sub>fbpB85</sub>-HA-Teilfragment wurde durch Standard-PCR mit den Primern VIII und XI amplifiziert und das *atpD*-Teilfragments mit den Primer XII und VII. Für die Fusions-PCR wurden die gleichen Bedingungen gewählt. Unter Verwendung der Primer VIII und VII wurde das Fusionskonstrukt P<sub>fbpB85</sub>-HA-*atpD* amplifiziert. Es wurde nach der gleichen Strategie in die mykobakteriellen Shuttle-



Vektoren pOLYG, pMV361-hyg und pMV361 $\Delta$ int-hyg kloniert wie für P<sub>19kDa</sub>-HA-*atpD* beschrieben. Die entstandenen Plasmide wurden als pOLYG-P<sub>fbpB85</sub>-HA-*atpD*, pMV361-hyg-P<sub>fbpB85</sub>-HA-*atpD*, pMV361 $\Delta$ int-hyg-P<sub>fbpB85</sub>-HA-*atpD* bezeichnet.

### **3.2.17.2 Generierung von AtpD-Expressionskonstrukten mit C-terminaler Erkennungssequenz**

Eine Interferenz der N-terminalen Erkennungssequenz mit der Sekretion von AtpD ist nicht auszuschliessen. Daher wurden zu den N-terminalen auch C-terminal markierte Expressionskonstrukte kloniert.

Zur Generierung des Fusionskonstrukts P<sub>19kDa</sub>-*atpD*-HA wurde diesmal an das *atpD*-Gen eine C-terminale HA-Erkennungssequenz angehängt werden. Dazu wurde das *atpD*-HA in einer Standard-PCR mit Hilfe der Primer III und IV, aus genomischer DNA von *M. tuberculosis* amplifiziert. Die 19kDa-Promotorregion wurde in einer Standard-PCR mit den Primern I und II aus genomischer DNA von *M. tuberculosis* gewonnen. Zur Generierung des P<sub>19kDa</sub>-*atpD*-HA-Fusionskonstrukts wurden die Teilfragmente P<sub>19kDa</sub> und *atpD*-HA verwendet. Unter Verwendung der Primer I und IV wurde durch Fusions-PCR das Produkt P<sub>19kDa</sub>-HA-*atpD* erhalten. Das Fusionskonstrukt P<sub>19kDa</sub>-HA-*atpD* wurde über die *HpaI*-Restriktionsstelle in den Klonierungsvektor pMCS5 zwischenkloniert. Für die Klonierungen in die mykobakteriellen Shuttle-Vektoren wurde das Fusionskonstrukt über die *HpaI*-Restriktionsstelle aus dem Vektor pMCS5-P<sub>19kDa</sub>-HA-*atpD* herausgeschnitten. Die Klonierungen in die mykobakteriellen Shuttle-Vektoren erfolgte wie bereits in 3.2.17.1 beschrieben. Die erhaltenen Expressionskonstrukte wurden als pOLYG- P<sub>19kDa</sub>-*atpD*-HA, pMV361-hyg-P<sub>19kDa</sub>-*atpD*-HA und pMV361 $\Delta$ int-hyg-P<sub>19kDa</sub>-*atpD*-HA bezeichnet.

Bei der Generierung des Fusionskonstrukts P<sub>fbpB85</sub>-*atpD*-HA wurde nach der gleichen Strategie wie für das P<sub>19kDa</sub>-*atpD*-HA verfahren. Das *atpD*-Teilfragment wurde durch Standard-PCR mit den Primern X und IV, die Promotorregion mit den Primern VIII und IX amplifiziert. Unter Verwendung der Primern VIII und VII wurde das Fusionskonstrukt P<sub>fbpB85</sub>-HA-*atpD* bei Standard-Fusions-PCR Bedingungen amplifiziert. Es wurde nach der gleichen Strategie in die mykobakteriellen Shuttle-Vektoren kloniert wie für P<sub>19kDa</sub>-*atpD*-HA beschrieben. Die Expressionskonstrukte wurden als pOLYG-P<sub>fbpB85</sub>-*atpD*-HA, pMV361-hyg-P<sub>fbpB85</sub>-*atpD*-HA und pMV361 $\Delta$ int-hyg-P<sub>fbpB85</sub>-*atpD*-HA bezeichnet.

### **3.3 Biochemische und immunologische Methoden**

#### **3.3.1 Proteinreinigung**

##### **3.3.1.1 Totalprotein-Extrakte aus Mykobakterien**

Die Bakterien wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 4.400 rpm (4°C) bis zu einer  $OD_{600} = 20$  konzentriert. Die gewonnenen Mykobakterien wurden in 500 µl PBS resuspendiert, 5 min bei 8000 rpm (4°C) zentrifugiert und in 200 µl PBS gelöst. Nach Zugabe von 100 µl *glas beads* wurden die Zellen durch Vortexen 10 min homogenisiert. Die Suspension wurde 10 min bei 13.000 rpm (4°C) zentrifugiert und der proteinhaltige Überstand bei –20°C gelagert.

##### **3.3.1.2 Ethanolpräzipitation von Proteinen**

Um die Proteine zu fällen, wurde die Methode der Ethanolpräzipitation gewählt. Dazu wurde die Suspension mit kaltem Ethanol (Endkonzentration 95%) versetzt und 2 h bei –80°C inkubiert. Die Proteine wurden durch Zentrifugation (10 min bei 13.000 rpm, 4°C) pelletiert. Das Pellet wurde luftgetrocknet und in entsprechendem Volumen Natriumphosphatlösung gelöst.

##### **3.3.1.3 Totalprotein-Extrakte der überexprimierten His<sub>6</sub>-Fusionsproteine**

Die mit den Expressionskonstrukten transformierten *E. coli* BL21-CodonPlus®(DE3)-RP wurden mit IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert und inkubiert. Die Totalprotein-Extrakte wurden mit SDS-Probenpuffer (Biorad) gemischt und 5 min auf 96°C erhitzt. Für nähere Informationen siehe Handbuch Stratagene, 2002, BL21-CodonPlus® Competent Cells, Revision #42005b.

#### **3.3.2 Horizontale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird verwendet um komplexe Proteinuntereinheiten von einander zu trennen oder Proteine für die weitere Verwendung zu reinigen. Die Proteine werden dazu in einer diskontinuierlichen, denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Auftrennung der Proteine erfolgt in 8-12%igen Gelen unter Verwendung von horizontalen Elektrophoresekammern. Die Proben wurden mit ½ Volumen SDS-Probenpuffer (Biorad) gemischt, 5 min bei 95°C denaturiert und zusammen mit dem Proteinmarker auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in Laufpuffer bei 60 mA/h. Zur Darstellung der aufgetrennten Proteine wurden die Trenngele für 1-2 h in Coomassie-Blau-Lösung

(Biorad) gefärbt. Danach wurden die Gele in mehrfach gewechselter Entfärbelösung (Biorad) inkubiert, bis die Banden deutlich vom Hintergrund zu unterscheiden waren. Zur Aufbewahrung wurde das Gel für 15 min in destilliertem Wasser gewaschen und anschliessend getrocknet.

### **3.3.3 Immunoblot-Analyse (Western Blot)**

Für den spezifischen Nachweis wurden die Proteine nach Auftrennung in der SDS-PAGE mit Hilfe der semidry-Methode auf Polyvinyliden-Difluorid (PVDF)-Membranen transferiert. Nach dem Elektroblothing (30 min, 200-300 mA) wurden die Membranen in Blockpuffer für 12-14 h bei 4°C inkubiert. Danach wurden die PVDF-Membranen mit spezifisch bindenden Antikörpern, in den entsprechenden Verdünnungen bei 4°C inkubiert. Die Immundetektion erfolgte mittels einer Peroxidase, die an anti-Maus-Antikörper gebunden ist. Bei der anschliessenden Detektion wurde „enhanced Chemiluminescence“ (Amersham Biosciences) verwendet und auf einen Film (Kodak) exponiert.

### **3.4 Zellbiologische Methoden**

Die Zelllinien wurden, wenn nicht anders angegeben, in Zellkulturflaschen der Firma Fisher Scientific bei 37°C in Gegenwart von 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Zellkulturplatten von TPP (Fisher Scientific) bezogen. Primäre Zellen, BMDM, wurden in Petrischalen der Firma Greiner kultiviert.

#### **3.4.1 Zellzahlbestimmung von eukaryotischen Zellen**

Die Zellzahlbestimmung der eukaryotischen Zellen erfolgte durch auszählen in einer Neubauerkammer.

#### **3.4.2 Kultivierung von Zelllinien**

Die verwendeten Zelllinien J-774 und A-549 wurden in DMEM+FCS und die Zelllinie L-929 in DMEM+FCS+P/S kultiviert.

##### **3.4.2.1 J-774**

Die adhärenenten und konfluenten Kulturen wurden zweimal pro Woche geteilt. Dazu wurde das Kulturmedium abgezogen und die adhärenenten Zellen mit einem Zellschaber vom Zellkulturflaschenboden gelöst. Die abgelösten Zellen wurden in DMEM+FCS resuspendiert und in einer Menge von ca.  $1-2 \times 10^6$  in eine neue 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche ausgesät.

##### **3.4.2.2 A-549**

Die adhärenenten und konfluenten Kulturen wurden einmal pro Woche geteilt. Dazu wurde das Kulturmedium abgezogen und ca. 3–4 ml einer Trypsin/EDTA Lösung für ca. 5–10 min zu den adhärenenten Zellen gegeben. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von DMEM+FCS gestoppt und in einer Menge von ca.  $1-2 \times 10^6$  in eine neue 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche ausgesät.

##### **3.4.2.3 L-929**

Die adhärenenten und konfluenten Kulturen wurden einmal pro Woche geteilt. Dazu wurde das Kulturmedium abgezogen und 1 ml einer Trypsin/EDTA Lösung für ca. 5 min zu den adhärenenten Zellen gegeben. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von 10 ml DMEM+FCS gestoppt und in einer Menge von ca.  $1-2 \times 10^6$  in eine neue 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche ausgesät.

### **3.4.3 Einfrieren von Zellen**

Zellen einer gut bewachsenen 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche wurden in ein Falcontube überführt, für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert und das Zellpellet wurde anschließend in 6 ml Gefrierzell-Medium resuspendiert. Aliquots von 1 ml wurden langsam im -80°C Gefrierschrank eingefroren, eine längere Lagerung fand in Stickstofftanks statt.

### **3.4.4 Auftauen von Zellen**

Aliquots von 1 ml wurden im 37°C Wärmeschrank aufgetaut, in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in warmen Kulturmedium (DMEM+FCS) resuspendiert und in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche ausgesät.

### **3.4.5 Herstellung von LCCM 1 und 2**

Zur Herstellung von LCCM wurden 0,28 x 10<sup>6</sup> L-929 Zellen in 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit 100 ml Kulturmedium (DMEM+FCS+P/S) ausgesät. Die Kulturen wurden für 7 Tage inkubiert, während dieser Zeit wurden die Kulturflaschen mehrmals leicht geschwenkt. Nach 7 Tagen wurde das gesamte Kulturmedium (LCCM 1) abgenommen und steril filtriert. Aliquots von 50 ml wurden bei -20°C gelagert.

Zu den Zellen wurde anschließend 100 ml neues Kulturmedium (DMEM+FCS+P/S) gegeben und erneut für weitere 7 Tage inkubiert. Nach dieser Zeit wurde wiederum das gesamte Kulturmedium (LCCM 2) abgezogen und steril filtriert. Aliquots von 50 ml wurden bei -20°C gelagert.

### **3.4.6 Gewinnung von BMDM aus Mäusen**

Die primären Zellen, BMDM, wurden im BMDM-Medium angezogen.

Die BMDM wurden durch Kultivierung von Knochenmarkzellen aus Femur und Coxa von C57BL/6 Mäusen gewonnen (Reiling *et al.*, 2001). Dazu wurden Femur und Coxa der mit CO<sub>2</sub> euthanasierten Mäuse präpariert und mit einer 26G Nadel und Kulturmedium (DMEM) durchspült. Die aufgefangenen Zellen wurden in ein neues Falcontube überführt, 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert und das Zellpellet in 20 ml BMDM-Medium resuspendiert. Je 10 ml der Zellsuspension wurden in eine Petrischale überführt und für mindestens 20 h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Tag (Tag 1) wurde das Medium mit den nicht adhären Zellen abgenommen, die Petrischalen mit BMDM-Medium gespült, für 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert und das Zellpellet in 30 ml BMDM-Medium resuspendiert und in drei neue Petrischalen überführt. Die Inkubation erfolgte bei

37°C, 5% CO<sub>2</sub>. An Tag 4 erfolgte ein Wechsel des BMDM-Mediums. Die ausdifferenzierten adhärenenten BMDM wurden ab Tag 7 für Infektionsversuche eingesetzt.

Die adhärenenten BMDM wurden durch Zugabe von 5 ml Accutase (5 bis 10 min, 37°C und 5% CO<sub>2</sub>) vom Boden der Petrischale gelöst, 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert, in einer Neubauerkammer ausgezählt und in entsprechender Dichte in Zellkultur Testplatten ausgesät. Die Ausbeute an BMDM aus einer C57BL/6 Maus betrug  $\sim 4\text{-}5 \times 10^6$ .

### **3.4.7 In vitro Infektionen**

Für Infektionen von eukaryotischen Zellen wurde diese am Vorabend der Infektion geerntet und entsprechend der gewünschten Dichte im Triplikat (pro Stamm) in einer 24iger Zellkultur Testplatte ausgesät.

#### **3.4.7.1 Intrazelluläres Überleben von *M. tuberculosis***

Für die Bestimmung des intrazellulären Überlebens von *M. tuberculosis* in eukaryotischen Zellen wurden diese infiziert und die Anzahl intrazellulärer Bakterien durch ausplattieren der lysierten Wirtszelle bestimmt. Das intrazelluläre Überleben wurde über einen Zeitraum von neun Tagen beobachtet und an je 6 Zeitpunkten (0d, 1d, 3d, 4d, 7d, 9d) die Anzahl intrazellulärer Bakterien bestimmt.

Für die CFU-Bestimmung wurden BMDM in einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml verwendet und eine MOI von Bakterien/Zelle von 0.5 gewählt (0,1 OD =  $1 \times 10^8$  Bakterien). Nach Zugabe der vorgewärmten Bakteriensuspension (Bakterien in DMEM+FCS) wurden die Zellkultur Testplatten anzentrifugiert (5 min, 300 rpm). Die Infektion der eukaryotischen Zellen erfolgte für 3 h, 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Als Kontrolle wurde das hergestellte Bakterieninokulum in verschiedenen Verdünnungen ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ) auf 7H10 Agarplatten ausplattiert.

Nach der Infektionszeit wurde die Bakteriensuspension entfernt, mit warmen DMEM gewaschen und erneut warmes DMEM+FCS zu den infizierten eukaryotischen Zellen gegeben.

Die infizierten eukaryotischen Zellen wurden für neun Tage inkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) und die Lyse (3.4.7.3) der Wirtszelle erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten.

#### **3.4.7.2 Bestimmung der Phagozytoserate von *M. tuberculosis***

Für die Bestimmung der Phagozytoserate wurden J-774 ( $1 \times 10^5$ ) und BMDM ( $1 \times 10^5$ ) verwendet und eine MOI von Bakterium/Zelle von 10 für J-774 und BMDM gewählt. Als Kontrolle wurde das hergestellte Bakterieninokulum in verschiedenen Verdünnungen ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ) auf 7H10 Agarplatten ausplattiert. Die Infektion wurde wie in 3.4.7.1

beschrieben durchgeführt, jedoch erfolgte die Infektion für 1 h mit einer anschliessenden Lyse (3.4.7.3) der Wirtszelle.

#### **3.4.7.3 Lyse der eukaryotischen Zellen**

Für die Lyse der Wirtszellen wurden der Zellkulturüberstand und die adhärenen Zellen getrennt behandelt. Nach Überführen des Zellkulturüberstandes in ein 2 ml Reaktionsgefäss wurden die adhärenen Zellen mit 1 ml eiskaltem dH<sub>2</sub>O bedeckt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschliessend wurden je 300 µl 7H9 und 60 µl 1% SDS zu den adhärenen Zellen und dem Zellkulturüberstand gegeben, für weitere 10 min bei RT inkubiert und je 150 µl 20% BSA hinzugefügt. Die lysierten resuspendierten Zellen aus dem Zellkulturüberstand sowie die in ein 2 ml Reaktionsgefäss überführten adhärenen Zellen, wurden dann für 10 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 1 ml 7H9 vereinigt und in verschiedenen Verdünnungen auf 7H10 Agarplatten ausplattiert. Die Inkubation der mit Parafilm verschlossenen 7H10 Agarplatten erfolgte für 3-4 Wochen bei 37°C.

#### **3.4.8 In vivo Infektionsexperimente**

Die *in vivo* Maus-Infektionsexperimente wurden von Kollaborationspartnern am *Research Center* in Borstel, Deutschland, und im *Central Institute for Tuberculosis* in Moskau, Russland, durchgeführt.

##### **3.4.8.1 Histologie**

Für die histologischen Untersuchungen wurden die Gewebe in 5% Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und anschließend 2-5 µm dicke Schnitte angefertigt. Die auf Objektträgern fixierten Schnitte wurden entparaffiniert und mit Hämatoxylin und Eosin (HE; Sigma) gefärbt.

##### **3.4.8.2 In vivo Infektionsexperimente: Adenylatcyclasen**

Die Maus-Infektionsexperimente mit den generierten *M. tuberculosis* Adenylatcyclasen Knockout Mutanten wurden im Forschungszentrum Borstel, Borstel, Deutschland, durchgeführt.

Weibliche 6 – 8 Wochen alte SPF C57BL/6 Mäuse wurden unter Sicherheitsbedingungen der Stufe 3 mit 100 – 1000 CFU pro *M. tuberculosis* Stamm für 40 min in einer Expositions-Kammern (Glas-Col, Terre-Haut, IN) aerogen infiziert. Nach 24 h wurden die Inokula durch CFU Bestimmung in der Lunge von 3 infizierten Mäusen pro Tuberkulose Stamm bestätigt. Pro Zeitpunkt wurden 4–5 Mäuse entsprechend der ethischen Richtlinien getötet, die Organe entnommen, gewogen und homogenisiert. Zu den

gewählten Zeitpunkten wurden verschiedene 10fach Verdünnungen der Homogenate von Lungen, Milz und Leber auf 7H10 Agarplatten ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert CFU/Organ  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

#### **3.4.8.3 *In vivo* Infektionsexperimente: *hbhAΔ***

Die Maus-Infektionsexperimente mit der *M. tuberculosis hbhAΔ* Knockout Mutante wurden im *Central Institute for Tuberculosis* von Moskau, Russland, durchgeführt.

C57BL/6 Mäuse wurden unter Sicherheitsbedingungen der Stufe 3 intravenös (i.v.) mit  $10^5$  CFU/Maus und intratracheal (i.t.) mit  $10^3$  CFU/Maus *M. tuberculosis* Stämmen der logarithmischen Wachstumsphase infiziert. Die Inokula wurden durch CFU Bestimmung bestätigt. Pro Zeitpunkt wurden 4 Mäuse entsprechend der ethischen Richtlinien getötet, die Organe entnommen, gewogen und homogenisiert. An den gewählten Zeitpunkten wurden verschiedene 10fach Verdünnungen der Homogenate des Milz- und Lungengewebes auf Dubos Agarplatten ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert CFU/Organ  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Für das Langzeitüberleben wurden 5–6 Mäuse pro *M. tuberculosis* Stamm mit  $10^5$  CFU/Maus i.v. infiziert.

#### **3.4.8.4 Bestimmung der *in vivo* Phagozytoserate von *hbhAΔ***

C57BL/6 Mäuse wurden vor der Infektion intraperitoneal (i.p.) mit 3% Pepton injiziert. Die Pepton-Injektion erfolgte für die Gewinnung neutrophiler Granulozyten 18 h, für die Gewinnung von Makrophagen 96 h vor der Infektion. Die Infektion wurde mit  $10^8$  Mykobakterien durchgeführt. Die Mäuse wurden 2.5 h nach Infektion getötet und die Bauchhöhle von je 3 Mäusen bis zu 3-mal mit PBS ausgespült. Die isolierten Neutrophilen Granulozyten und Makrophagen wurden durch Cytospin-Präparation auf die Objektträger aufgebracht, getrocknet und anschließend mit 96% Ethanol fixiert. Der Nachweis von intrazellulären Mykobakterien erfolgte durch eine Ziehl-Neelsen-Färbung und die eukaryotischen Zellen wurden mit Giemsa angefärbt. Die Phagozytoserate wurde mikroskopisch, durch auszählen von mindestens 40 Gesichtsfelder, bestimmt.

#### **3.4.8.5 Bestimmung der *in vitro* Phagozytoserate von *hbhAΔ***

Die Lungenmakrophagen wurden wie in (Majorov *et al.*, 2003) beschrieben isoliert. Dazu wurden Einzelzellen der Lunge durch enzymatische Spaltung gewonnen (Lyadova *et al.*, 2000), gewaschen und in Zellkulturmedium (RPMI) aufgenommen. Die Zellen wurden anschliessend für 1,5 h bei 37°C in Zellkulturmedium in Petrischalen inkubiert. Nicht adhärente Zellen wurden durch mehrmaliges waschen entfernt. Die adhärennten Zellen



wurden nach ablösen mit EDTA-PBS gewaschen und in Zellkulturmedium resuspendiert. Die Viabilität der Zellen wurde mit Trypanblaufärbung getestet und lag bei >93%. Nach erfolgreicher Isolation wurden die an Deckgläschen anheftenden Lungenmakrophagen mit den mykobakteriellen Stämmen mit einer MOI von 10 Bakterien/Zelle infiziert. Nach einer 6 stündigen Inkubation wurden die infizierten Lungenmakrophagen mit 2% Paraformaldehyd fixiert und die intrazellulären Mykobakterien mit einer Ziehl-Neelsen Färbung sichtbar gemacht. Die Gegenfärbung der Lungenmakrophagen erfolgte mit einer Giemsa-Färbung. Die Auswertung erfolgte ebenfalls mikroskopisch wobei 400 Zellen in mindestens 35 Gesichtsfeldern ausgezählt wurden.

#### **3.4.8.6 Bestimmung der Phagozytoserate in Gegenwart von Heparin**

Für die Bestimmung der Phagozytoserate in Gegenwart von Heparin (*deaminated sodium salt from porcine intestinal mucosal*, Sigma) wurden BMDM ( $1 \times 10^5$ ) verwendet und mit einer MOI von Bakterium/Zelle von 10 infiziert. Dazu wurde die hergestellte Bakteriensuspension (DMEM/FCS) mit oder ohne Heparin (10 µg/ml in H<sub>2</sub>O) für 45 min präinkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% Luftfeuchtigkeit). Als Kontrolle wurde das hergestellte Bakterieninokulum (mit/ohne Heparin) in verschiedenen Verdünnungen ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ) auf 7H10 Agarplatten ausplattiert. Die Infektion wurde wie in 3.4.7.1 beschrieben durchgeführt, jedoch erfolgte die Infektion für 1 h mit einer anschließenden Lyse (3.4.7.3) der Wirtszelle.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Adenylatcyclasen als Virulenzfaktor

#### 4.1.1 Adenylatcyclase Rv1264

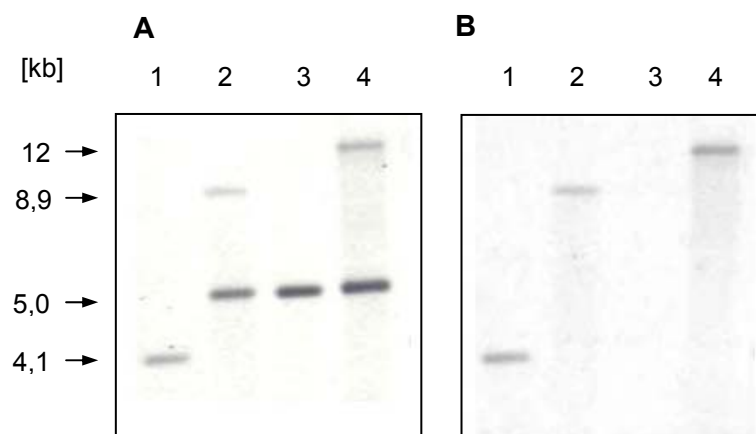
Das Gen von ORF Rv1264 im Genom von *M. tuberculosis* kodiert eine Adenylatcyclase der Klasse IIIC mit einer Länge von 397 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 42 kD. Diese Adenylatcyclase zeigt strukturelle Eigenschaften von AC, welche charakteristisch für AC Gram-positiver Bakterien sind. Die Adenylatcyclase Rv1264 besitzt enzymatische Aktivität bei einer heterologen Expression in *E. coli* und ist als Homodimer aktiv. Der C-Terminus dieser AC bildet die katalytisch aktive Domäne und enthält dieselben Aminosäuren, welche wichtig für die Aktivität von Säuger-AC sind, während der N-Terminus autoinhibitorisch auf die Aktivität von Rv1264 wirkt (Linder *et al.*, 2002). Desweiteren wurde gezeigt, dass der N-Terminus als pH Sensor fungiert und die höchste enzymatische Aktivität des Holoenzym bei einem pH-Wert von 6,0 liegt (Tews *et al.*, 2005). Die Säure-abhängige Aktivität von Rv1264 lässt vermuten, dass diese AC ein bakterieller Sensor von *M. tuberculosis* ist, welcher den intraphagosomalen pH-Wert wahrnimmt. Das von Rv1264 gebildete cAMP könnte die Adaptation von *M. tuberculosis* regulieren oder aber mit einer cAMP-regulierten Wirtszellsignalkaskade interferieren. Untersuchungen eines anderen Mitgliedes der Ordnung Actinomycetales, *Streptomyces coelicolor*, zeigten, dass *cya*, ein Homolog von Rv1264, unter sauren Bedingungen physiologische Bedeutung besitzt. Eine *S. coelicolor cya* Mutante kann das durch Wachstum auf glukosehaltigem Medium angesäuerte Medium nicht neutralisieren und es kommt zu einem Wachstums- und Sporulationsende. Die beobachteten Effekte sind auf das Fehlen von cAMP, welches durch Cya synthetisiert wird, zurückzuführen (Susstrunk *et al.*, 1998a).

##### 4.1.1.1 Charakterisierung der pH sensitiven Rv1264 Adenylatcyclase Mutante von *M. tuberculosis*

*M. tuberculosis* kann innerhalb von Phagosomen überleben und deren Reifung hemmen. Es kommt nicht zu einer vollständigen phagosomalen Ansäuerung (Hestvik *et al.*, 2005). Für die Inhibition der Phagosomenreifung könnte Rv1264 als pH-Sensor eine wichtige Rolle einnehmen, und es so *M. tuberculosis* ermöglichen, sich den Bedingungen innerhalb des Phagosomen anzupassen. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde ein *M. tuberculosis* Rv1264 Knockout-Stamm generiert und in *in vitro* als auch *in vivo* Infektionsmodellen untersucht.

#### 4.1.1.1.1 Inaktivierung von *M. tuberculosis* Rv1264

Die Inaktivierung von *M. tuberculosis* Rv1264 erfolgte mit Hilfe der rpsL-Gegenselektionsstrategie. Die Transformation von *M. tuberculosis* erfolgte mit dem Vektor ptrpA1-rpsL+Rv1264Δ::hyg, wie in 3.2.16.1 beschrieben. Die erhaltenen Transformanten wurden mittels Southern Blot analysiert. Die chromosomale DNA wurde dazu mit *Eco*47III geschnitten und die Hybridisierung mit der Rv1264 5'-DNA-Sonde und der DNA-Sonde des deletierten DNA-Abschnittes durchgeführt (2.7). Bei dem gewählten Restriktionsverdau wurde ein Signal für *M. tuberculosis* Wildtyp mit der Rv1264 5'-DNA-Sonde bei 4,1 kb erwartet, für den *single crossover* (sco) Rv1264 bei 8,9 und 5,0 kb, für den Knockout Stamm Rv1264Δ bei 5,0 kb. Der *single crossover* Stamm, ein Zwischenprodukt bei der Generierung einer Knockout Mutante, ist charakterisiert durch das Vorhandensein eines funktionalen Rv1264 Genes (8,9 kb) und einer inaktiven Form (5,0 kb). Der Banden-Shift von 4,1 kb beim Wildtyp Stamm zu 5,0 kb bei der Deletionsmutante ergibt sich durch die Deletion eines 887 bp grossen DNA-Bereiches und der Insertion der 1,8 kb Hygromycin-Kassette. Die erwarteten Hybridisierungsmuster von Wildtyp, sco und Knockout Mutante wurden gefunden (Abbildung 4-1 A). Bei erneuter Hybridisierung des Southern Blots mit der Deletionssonde, fand sich erwartungsgemäss kein Signal bei der inaktiven Form von Rv1264 im sco und im Knockout Stamm (Abbildung 4-1 B). Der Stamm Rv1264Δ wurde mit dem mykobakteriellen integrativen Vektor pMV361-hyg+Rv1264 komplementiert.

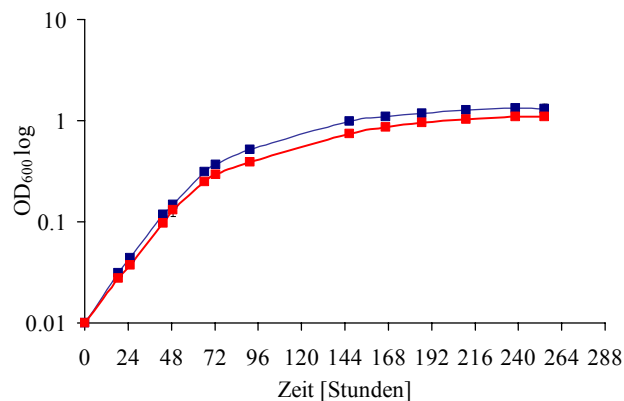


**Abbildung 4-1 Genotypische Charakterisierung von *M. tuberculosis* Rv1264Δ**

Southern Blot Analyse von **Spur 1:** *M. tuberculosis* H37Rv (4,1 kb); **Spur 2:** *M. tuberculosis* sco Rv1264 (5,0 und 8,9 kb); **Spur 3:** *M. tuberculosis* Rv1264Δ (5,0 kb); **Spur 4:** *M. tuberculosis* Rv1264Δ Komplementation (5,0 und 12 kb). Verdau der genomischen DNA mit *Eco*47III und Hybridisierung mit **A** Rv1264 5'-DNA-Sonde; **B** Deletions-Sonde.

#### 4.1.1.1.2 *In vitro* Charakterisierung von *M. tuberculosis* Rv1264Δ

Das *in vitro* Wachstum von *M. tuberculosis* Rv1264Δ wurde in Middlebrook 7H9 OADC Medium untersucht. Der Parentalstamm *M. tuberculosis* H37Rv und *M. tuberculosis* Rv1264Δ wurden aus einer Kultur in logarithmischer Wachstumsphase zu einer Optischen-Dichte von 0,01 inokuliert. Die beiden Stämme befanden sich 24 h nach Inokulation erneut in der logarithmischen Wachstumsphase und vermehrt sich mit gleicher Geschwindigkeit. Nach 96 h verlangsamte sich das Wachstum und ein Übergang in die stationäre Phase wurde erreicht. Nach 144 h waren beide Stämme in der stationären Phase und es war keine Zunahme der OD<sub>600</sub> mehr zu beobachten. Es wurde eine maximal OD<sub>600</sub> von 1,5 erreicht. Beide Stämme zeigten unter den gewählten Bedingungen ähnliche Wachstumsraten (Abbildung 4-2). Wachstum und Koloniemorphologie beider Stämme auf 7H10 Agarplatten waren ebenfalls identisch.



**Abbildung 4-2 Wachstumskurve von *M. tuberculosis* H37Rv und *M. tuberculosis* Rv1264Δ**

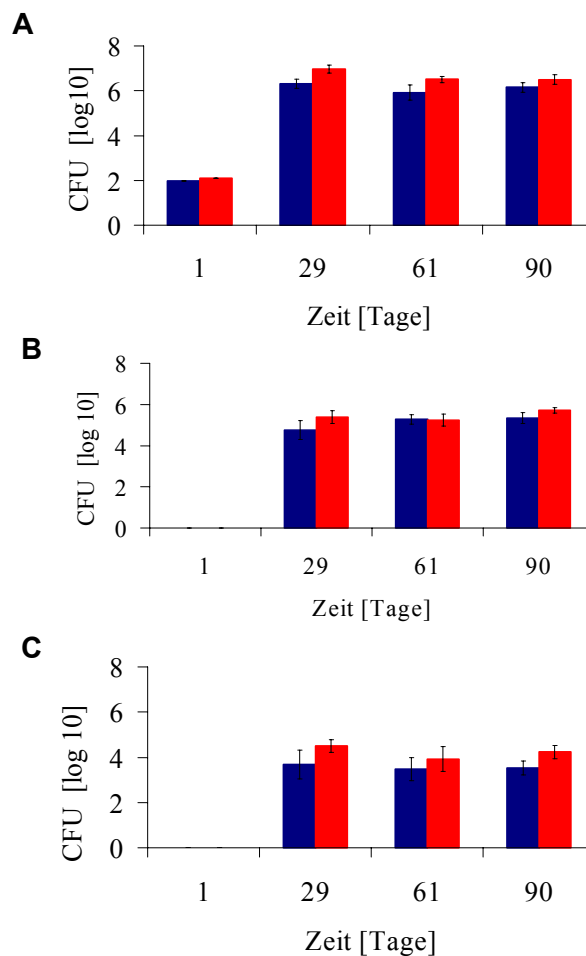
*In vitro* Wachstum von *M. tuberculosis* H37Rv (blau) und *M. tuberculosis* Rv1264Δ (rot) in Middlebrook 7H9 in einem Rollflaschen System. Darstellung eines Triplikat-Mittelwertes ± Standardabweichung (<0,02).

#### 4.1.1.1.3 *In vivo* Charakterisierung von *M. tuberculosis* Rv1264Δ

Um die Funktion der Adenylatcyclase Rv1264 als möglichen Virulenzfaktor zu untersuchen, wurden Infektionsversuche im Maus-Modell durchgeführt (3.4.8.2).

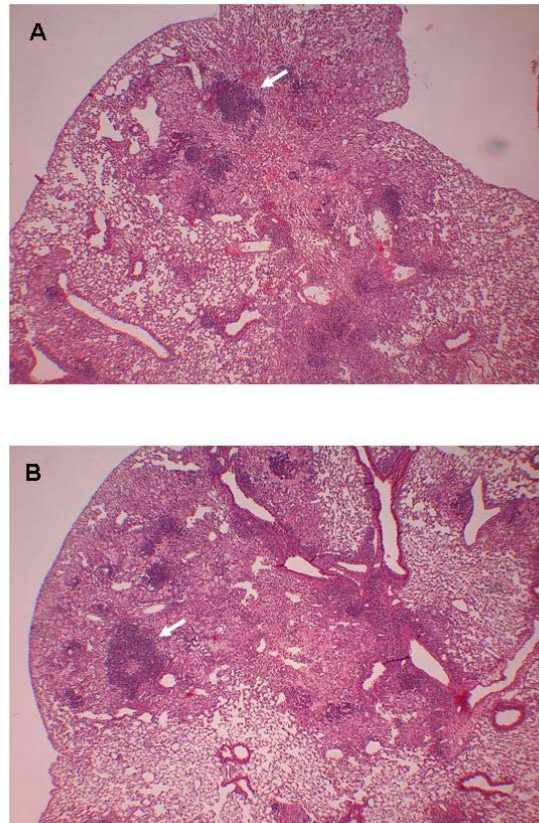
C57BL/6 Mäuse wurden aerogen mit *M. tuberculosis* H37Rv und *M. tuberculosis* Rv1264Δ infiziert. Die Inokula beider Stämme waren in den Lungen der infizierten Tiere, einen Tag nach Infektion nahezu gleich. Der Verlauf der Infektion wurde über einen Zeitraum von 90 Tagen beobachtet. Dazu wurde zu verschiedenen Zeitpunkten die Anzahl der Mykobakterien in Lunge, Leber sowie der Milz durch Bestimmung der CFU ermittelt. Es kam zu einer typischen Vermehrung von *M. tuberculosis* während der ersten 3-4 Wochen nach Infektion. Mit dem Einsetzen der zellulären Immunantwort fand der Übergang in die chronische Phase, charakterisiert durch eine konstante bakterielle

Belastung statt. Die Organe der mit dem Parentalstamm *M. tuberculosis* H37Rv und Rv1264 $\Delta$  infizierten Mäuse wiesen im Verlauf die charakteristischen Zeichen einer mykobakteriellen Infektion auf. Die beiden *M. tuberculosis* Stämme streuen mit gleicher Kinetik und Intensität in Milz und Leber (Abbildung 4-3). Das Lungengewebe der infizierten Mäuse war entzündet, es bildeten sich gleichfalls die typischen Granulome einer mykobakteriellen Infektion (Abbildung 4-4), unabhängig vom Genotyp des *M. tuberculosis* Stammes.



**Abbildung 4-3 In vivo Infektionsverlauf von *M. tuberculosis* H37Rv und *M. tuberculosis* Rv1264 $\Delta$  in C57BL/6 Mäusen nach aerogener Infektion**

Anzahl koloniebildender Einheiten (CFU) in **A** Lunge, **B** Milz und **C** Leber von 4 bis 5 C57BL/6 Mäuse/ Zeitpunkt nach aerogener Infektion mit *M. tuberculosis* H37Rv (blau) und *M. tuberculosis* Rv1264 $\Delta$  (rot). Darstellung von Mittelwerten CFU / Organ  $\pm$  Standardabweichung.



**Abbildung 4-4 HE gefärbte Lungengewebschnitte von C57BL/6 Mäusen nach aerogener Infektion mit *M. tuberculosis* H37Rv und *M. tuberculosis* Rv1264Δ, Vergrößerung: 4fach**

**A** *M. tuberculosis* H37Rv, **B** *M. tuberculosis* Rv1264Δ. Beide Lungen weisen entzündetes Lungengewebe mit Granulombildung (Pfeile) auf.

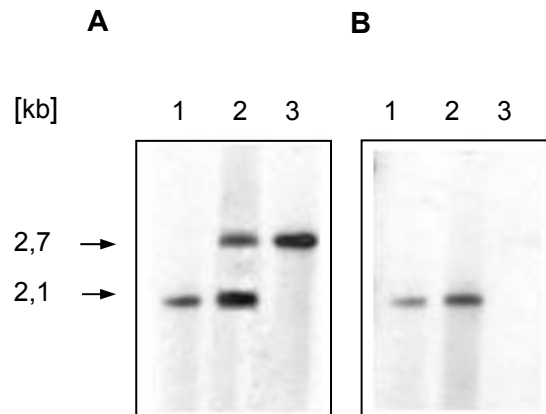
#### 4.1.2 Adenylatcyclase Rv1625c (*cya*)

Das Gen von ORF Rv1625c (*cya*) kodiert eine membranständige Adenylatcyclase der Klasse IIIa mit einer Länge von 443 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 47 kD. *Cya* ist eine von zwei AC von *M. tuberculosis*, welche strukturelle Eigenschaften von AC von Säugern zeigen. *Cya* bildet in der N-terminalen Domäne sechs Transmembranhelixes aus, der C-Terminus bildet eine zytosolische Domäne, in welcher das aktive Zentrum der Adenylatcyclase lokalisiert ist (Guo *et al.*, 2001; Reddy *et al.*, 2001). In einem heterologen *E. coli* Expressionssystem zeigt *Cya* Adenylatcyclase-Aktivität (Shenoy *et al.*, 2003) und bildet ein Homodimer mit zwei aktiven Zentren. Das aktive Zentrum wird dabei an der Grenzfläche der beiden Domänen gebildet (Tang & Hurley, 1998), als Metall-Kofaktor wird  $Mn^{2+}$  benötigt (Guo *et al.*, 2001; Reddy *et al.*, 2001; Shenoy *et al.*, 2003). Die katalytische Domäne von *Cya* zeigt Ähnlichkeiten sowohl zu Adenylatcyclasen als auch zu Guanylatcyclasen, sie beinhaltet dieselben Aminosäurereste wie Rv1264, welche wichtig für die Aktivität von AC in Säugern sind (Linder *et al.*, 2002).

##### 4.1.2.1 Charakterisierung der *M. tuberculosis* Adenylatcyclase *cya* Mutante

###### 4.1.2.1.1 Inaktivierung von *M. tuberculosis cya*

Die Inaktivierung von *M. tuberculosis cya* erfolgte mit Hilfe der *rpsL* Gegenselektionsstrategie. Die Konstruktion des Suizidvektors pBcya::aph-rpsL erfolgte wie in 3.2.16.2 beschrieben. Die Transformanten wurden mittels Southern Blot analysiert. Die chromosomale DNA wurde mit *NcoI* geschnitten und die Hybridisierung mit einer *cya*-DNA-Sonde bzw. einer DNA-Sonde des deletierten DNA-Abschnittes durchgeführt (2.7). Bei dem gewählten Restriktionsverdau wurde ein Signal für den H37Rv Parentalstamm mit der *cya*-DNA-Sonde bei 2,1 kb erwartet, für den *single crossover* Stamm bei 2,1 kb und 2,7 kb, für *cyaΔ* bei 2,7 kb. Der *single crossover* Stamm enthält ein funktionales *cya* Gen (2,1 kb) sowie eine inaktive Form (2,7 kb). Der Banden-Shift von 2,1 kb beim Wildtyp zu 2,7 kb bei der Inaktivierung von *cya* ergibt sich durch Deletion eines 622 bp grossen DNA-Bereiches und die Insertion der 1,2 kb Kanamycin-Kassette. Die erwartete Hybridisierungsmuster von Wildtyp, *sco* und Knockout Mutante wurden gefunden (Abbildung 4-5 A). Bei erneuter Hybridisierung des Southern Blots mit der Deletions-Sonde erschien kein Signal bei der inaktiven Form von *cya* (Abbildung 4-5 B).

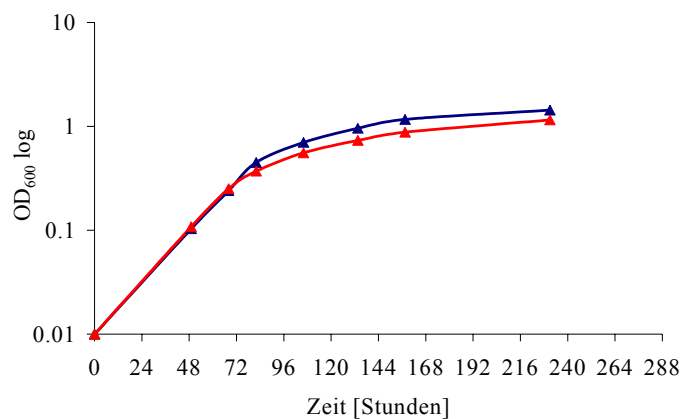


**Abbildung 4-5 Genotypische Charakterisierung von *M. tuberculosis cya*Δ**

Southern Blot Analyse von **Spur 1:** *M. tuberculosis* H37Rv (2,1 kb); **Spur 2:** *M. tuberculosis* SCO *cya*Δ (2,1 und 2,7 kb); **Spur 3:** *M. tuberculosis cya*Δ (2,7 kb); Verdau der genomischen DNA mit *Nco*I und Hybridisierung mit **A** *cya*Δ 5'DNA-Sonde; **B** Deletions-Sonde.

#### 4.1.2.1.2 *In vitro* Charakterisierung von *M. tuberculosis cya*Δ

Die Untersuchung des *in vitro* Wachstum von *M. tuberculosis cya*Δ erfolgte analog zur *in vitro* Charakterisierung von Rv1264Δ (4.1.1.1.2). Das *in vitro* Wachstum von *cya*Δ, durch Bestimmung der OD<sub>600</sub> über einen Zeitraum von 10 Tagen, war identisch mit dem des Wildtyps (Abbildung 4-6).



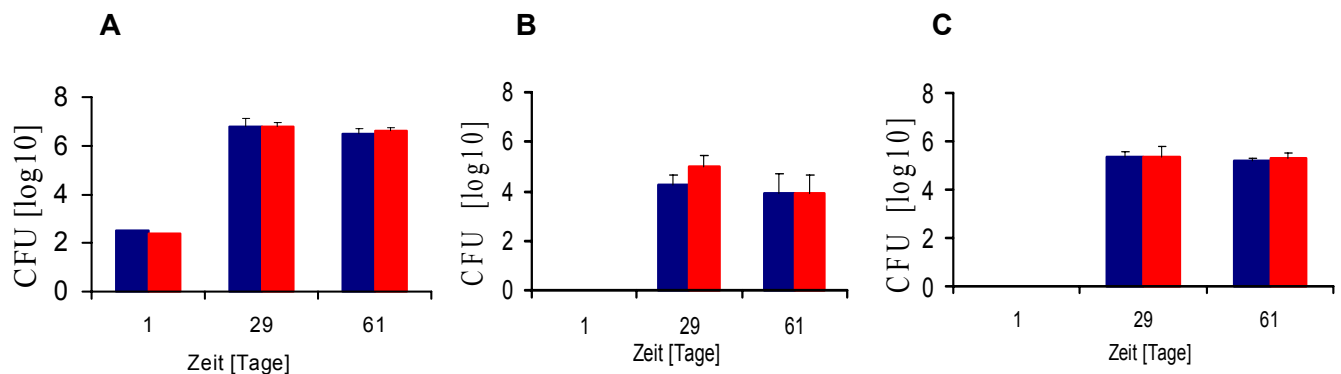
**Abbildung 4-6 Wachstumskurve von *M. tuberculosis* H37Rv und *M. tuberculosis cya*Δ**

*In vitro* Wachstum von *M. tuberculosis* H37Rv (blau) und *M. tuberculosis cya*Δ (rot) in Middlebrook 7H9 in einem Rollflaschen System. Darstellung eines Triplikat-Mittelwertes ± Standardabweichung (< 0,03).



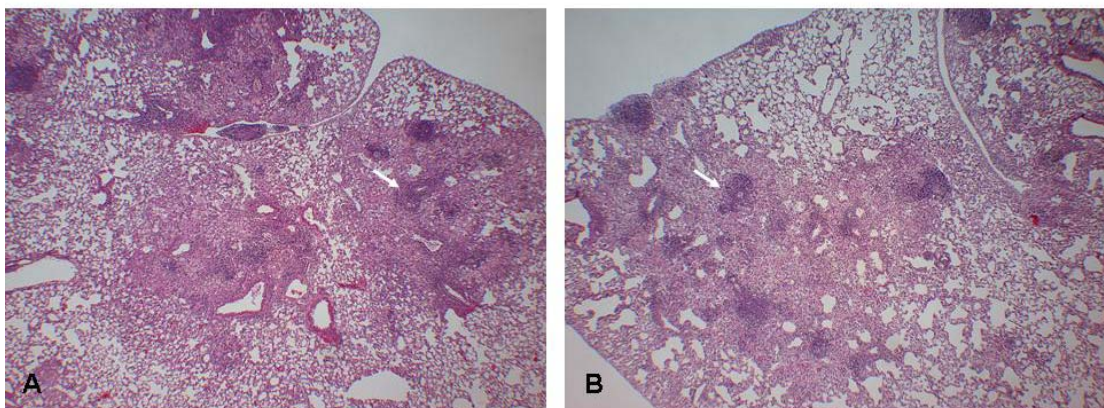
#### 4.1.2.2 *In vivo* Charakterisierung von *M. tuberculosis cya* $\Delta$

Die *in vivo* Charakterisierung von *M. tuberculosis cya* $\Delta$  erfolgte analog zu Rv1264 $\Delta$  (4.1.1.1.3). *M. tuberculosis* H37Rv und *M. tuberculosis cya* $\Delta$  vermehrten sich nach aerogener Infektion der Mäuse in der Lunge nahezu identisch und breiten sich mit gleicher Kinetik und Intensität in die Milz und die Leber aus (Abbildung 4-7). Das Lungengewebe wies charakteristische Entzündungsreaktionen auf und es fanden sich die typischen Granulome nach einer mykobakteriellen Infektion (Abbildung 4-8).



**Abbildung 4-7 *In vivo* Infektionsverlauf von *M. tuberculosis* H37Rv und *M. tuberculosis cya* $\Delta$  in C57BL/6 Mäusen nach aerogener Infektion**

Anzahl koloniebildender Einheiten (CFU) in **A** Lunge, **B** Milz und **C** Leber von 4 bis 5 C57BL/6 Mäusen/Zeitpunkt nach aerogener Infektion mit *M. tuberculosis* H37Rv (blau) und *M. tuberculosis cya* $\Delta$  (rot). Darstellung von Mittelwerten CFU/Organ  $\pm$  Standardabweichung.



**Abbildung 4-8 HE gefärbte Lungengewebschnitte von C57BL/6 Mäusen nach aerogener Infektion mit *M. tuberculosis* H37Rv und *M. tuberculosis cya* $\Delta$ , Vergrößerung: 4fach**

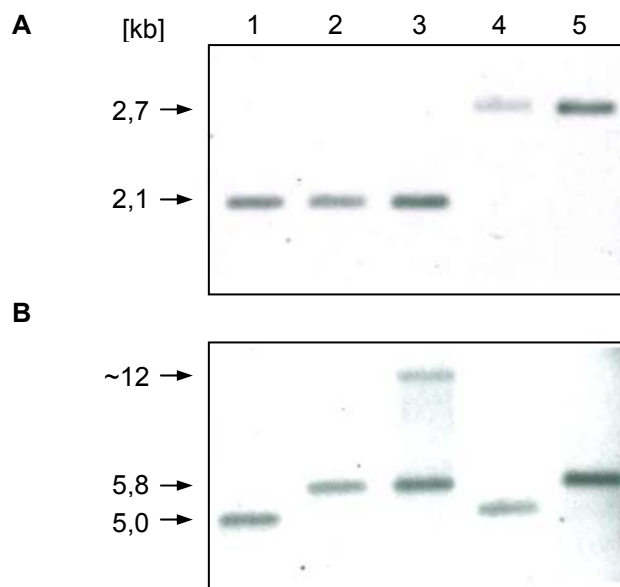
**A** *M. tuberculosis* H37Rv, **B** *M. tuberculosis cya* $\Delta$ . Beide Lungen weisen entzündetes Lungengewebe mit Granulombildung (Pfeile) auf.

### 4.1.3 Adenylatcyclasen-Doppel-Knockout Rv1264/cya

#### 4.1.3.1 Charakterisierung der *M. tuberculosis* Rv1264/cya Doppelmutante

##### 4.1.3.1.1 Inaktivierung von *M. tuberculosis* Rv1264/cya

Ausgehend vom *M. tuberculosis* Rv1264 Knockout Stamm wurde der Adenylatcyclase-Doppel-Knockout Stamm Rv1264/cya generiert. Die Transformation von *M. tuberculosis* Rv1264 $\Delta$  erfolgte mit dem Vektor pBcyA::aph-rpsL. Die Transformanten wurden mittels Southern Blot analysiert. Die chromosomale DNA wurde mit *Nco*I geschnitten und die Hybridisierung zunächst mit der *cya*-DNA-Sonde durchgeführt. Bei der gewählten Restriktion wurde ein Signal für den H37Rv Parentalstamm mit der *cya*-DNA-Sonde bei 2,1 kb erwartet, für den *M. tuberculosis* Rv1264 $\Delta$  Stamm bei 2,1 kb, für den komplementierten Rv1264 $\Delta$  Stamm bei 2,1 kb, für *M. tuberculosis cya* $\Delta$  bei 2,7 kb, für die Doppel-Knockout Mutante Rv1264 $\Delta$ /cya $\Delta$  bei 2,7 kb. Eine erneute Hybridisierung des Southern Blots mit der Rv1264 5'-DNA-Sonde bestätigte die Generierung eines Doppel-Knockout Stammes. Das erwartete Signal für *M. tuberculosis* H37Rv mit der Rv1264 5'-DNA-Sonde lag bei 5,0 kb, für den *M. tuberculosis* Rv1264 $\Delta$  Stamm 5,8 kb, beim komplementierten Rv1264 $\Delta$  Stamm bei 5,8 kb und ~12 kb, für *cya* $\Delta$  bei 5,1 kb (wie Wildtyp) und für den Doppel-Knockout Rv1264 $\Delta$ /cya $\Delta$  bei 5,8 kb (Abbildung 4-9).



**Abbildung 4-9 Genotypische Charakterisierung von *M. tuberculosis* Rv1264 $\Delta$ /cya $\Delta$**

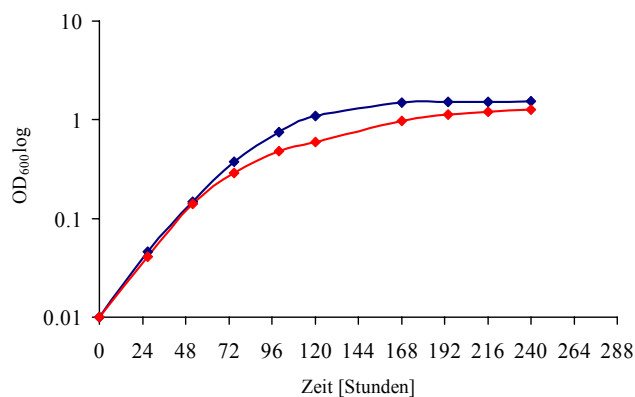
Southern Blot Analyse von **Spur 1:** *M. tuberculosis* H37Rv; **Spur 2:** *M. tuberculosis* Rv1264 $\Delta$ ; **Spur 3:** *M. tuberculosis* Rv1264 $\Delta$  Komplementation; **Spur 4:** *M. tuberculosis cya* $\Delta$ ; **Spur 5:** *M. tuberculosis* Rv1264 $\Delta$ /cya $\Delta$ ; Verdau der genomischen DNA mit *Nco*I und Hybridisierung mit **A** *cya* 5'-DNA-Sonde; **B** Rv1264 5'-DNA-Sonde.

#### 4.1.3.2 *In vitro* Charakterisierung von *M. tuberculosis* Rv1264Δ/cyaΔ

##### 4.1.3.2.1 *In vitro* Wachstum in Flüssigmedium 7H9

Die Untersuchung des *in vitro* Wachstums von Rv1264Δ/cyaΔ wurde analog zu den von Rv1264Δ und cyaΔ beschriebenen Wachstumsversuchen durchgeführt.

Der Parentalstamm H37Rv und Rv1264Δ/cyaΔ zeigten ähnliche Vermehrungsraten unter den gewählten Bedingungen (Abbildung 4-10). Wachstum und Koloniemorphologie beider Stämme auf 7H10 Agarplatten waren ebenfalls identisch.

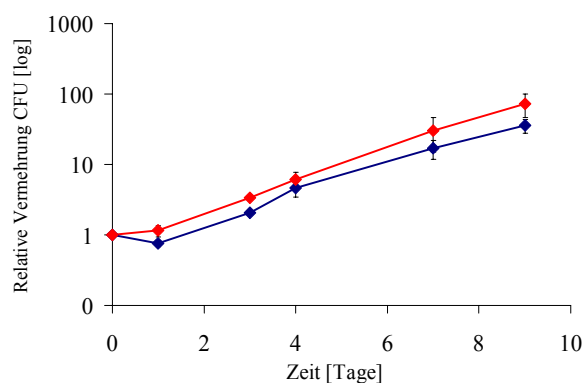


**Abbildung 4-10 Wachstumskurve von *M. tuberculosis* H37Rv und *M. tuberculosis* Rv1264Δ/cyaΔ**

*In vitro* Wachstums von *M. tuberculosis* H37Rv (blau) und *M. tuberculosis* Rv1264Δ/cyaΔ (rot) in Middlebrook 7H9 in einem Rollflaschen System. Darstellung eines Triplikat-Mittelwertes ± Standardabweichung (< 0,03).

##### 4.1.3.2.2 Intrazelluläres Überleben in Makrophagen

Die Virulenz von *M. tuberculosis* Rv1264Δ/cyaΔ wurde in einem Zellkultur-Infektionsmodell untersucht. Die Vermehrung des *M. tuberculosis* Parentalstammes und der Rv1264Δ/cyaΔ Mutante wurde in primären Makrophagen (BMDM von C57BL/6) verglichen. Die relative intrazelluläre Vermehrung in BMDM wurde über einen Zeitraum von 9 Tagen bestimmt. Beide Stämme zeigten eine Vermehrung um etwa 1,5 log. Diese Resultate lassen den Schluss zu, dass die Adenylatcyclasen Rv1264 und cya für das intrazelluläre Überleben von *M. tuberculosis* nicht notwendig sind.



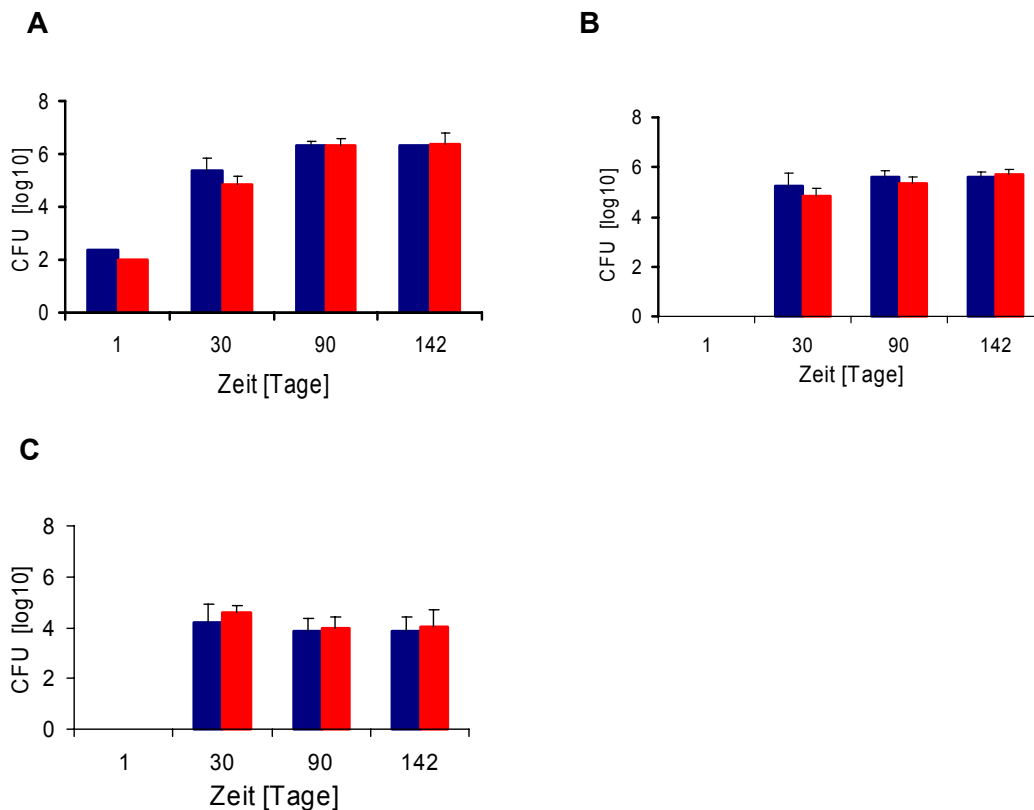
**Abbildung 4-11 Relative Vermehrungsrate von *M. tuberculosis* H37Rv und *M. tuberculosis* Rv1264Δ/cyaΔ in BMDM**

Relative Anzahl intrazellulärer Bakterien nach Infektion von BMDM von C57BL/6 Mäusen mit *M. tuberculosis* H37Rv (blau) und *M. tuberculosis* Rv1264Δ/cyaΔ (rot) über einen Zeitraum von 9 Tagen. Mittelwert ± Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen.

#### 4.1.3.3 *In vivo* Charakterisierung von *M. tuberculosis* Rv1264Δ/cyaΔ

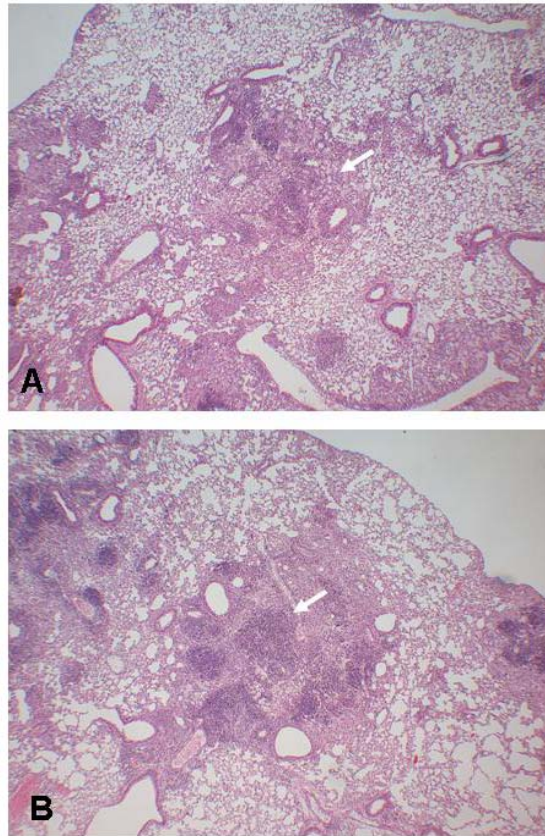
Die Untersuchungen zur *in vivo* Virulenz von *M. tuberculosis* Rv1264Δ/cyaΔ erfolgte unter gleichen Bedingungen wie bereits für die Einzel-Knockouts beschrieben (4.1.1.1.3/4.1.2.2).

C57BL/6 Mäuse wurden mit gleichen Inokula aerogen mit *M. tuberculosis* H37Rv und *M. tuberculosis* Rv1264Δ/cyaΔ infiziert. In den Lungen der infizierten Tiere fand sich einen Tag nach Infektion die nahezu gleiche Anzahl an CFU. Der Verlauf der Infektion wurde über einen Zeitraum von 150 Tagen beobachtet. Die Vermehrung der mykobakteriellen Stämme war in Lunge, Leber und Milz nahezu gleich (Abbildung 4-12). Das Lungengewebe wies Entzündungsreaktionen mit den typischen Granuloma einer mykobakteriellen Infektion auf (Abbildung 4-13).



**Abbildung 4-12 *In vivo* Infektionsverlauf von *M. tuberculosis* H37Rv und *M. tuberculosis* Rv1264Δ/cyaΔ in C57BL/6 Mäusen nach aerogener Infektion**

Anzahl koloniebildender Einheiten (CFU) in **A** Lunge, **B** Leber und **C** Milz von 4 bis 5 C57BL/6 Mäusen/Zeitpunkt nach aerogener Infektion mit *M. tuberculosis* H37Rv (blau) und *M. tuberculosis* Rv1264Δ/cyaΔ (rot). Darstellung von Mittelwerten CFU/Organ ± Standardabweichung.



**Abbildung 4-13 HE gefärbte Lungengewebschnitte von C57BL/6 Mäusen nach aerogener Infektion mit *M. tuberculosis* H37Rv und *M. tuberculosis* Rv1264Δ/*cya*Δ, Vergrößerung: 4fach**

**A** *M. tuberculosis* H37Rv, **B** *M. tuberculosis* Rv1264Δ/*cya*Δ. Beide Lungen weisen entzündetes Lungengewebe mit Granulombildung (Pfeile) auf.

## 4.2 Sekretionsproteine als Virulenzfaktoren

Die Sekretion von Proteinen ist für bakterielle Pathogene von grösster Bedeutung, da diese es ihnen ermöglichen, mit ihrem Wirt in Wechselwirkung zu treten. Die Sekretion von Proteinen kann durch unterschiedliche Sekretionssysteme erfolgen und die sekretierten Proteine haben verschiedene Funktionen bei der Wirt-Pathogen-Interaktion zu erfüllen. Sie dienen z.B. als Toxine, Adhäsine, Invasine, Proteasen oder Lipasen.

### 4.2.1 Die $\beta$ -Untereinheit der $F_0F_1$ -ATP Synthase von *M. tuberculosis*

Die  $F_0F_1$ -ATPase ist in zwei Domänen unterteilt, die membranäre  $F_0$ -Domäne und die ATP synthetisierende  $F_1$ -Domäne. Das mykobakterielle *atpD*-Gen kodiert für die  $\beta$ -Polypeptidkette in der  $F_1$ -Domäne. Bei der Untersuchung von mit *M. tuberculosis* infizierten Wirtszellen wurde innerhalb der Wirtszelle das mykobakterielle AtpD-Protein nachgewiesen (Ragno *et al.*, 2001). Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass das AtpD sekretiert wird.

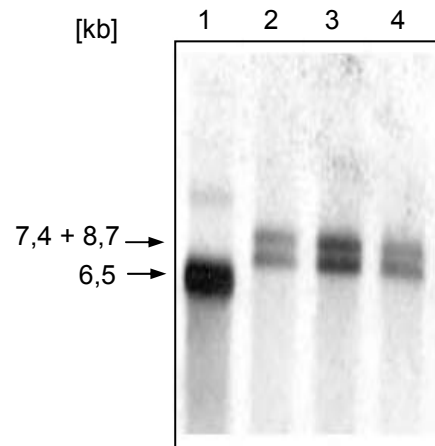
#### 4.2.1.1 Untersuchungen zu *M. tuberculosis* Rv1310 (*atpD*)

Um festzustellen, ob das *atpD*-Gen zur Virulenz von *M. tuberculosis* beiträgt, wurde zunächst versucht einen *M. tuberculosis atpD* Knockout Stamm zu generieren. Desweiteren wurden Untersuchungen zur Sekretion von AtpD mit verschiedenen generierten Expressionskonstrukten durchgeführt, die eine Lokalisation der  $\beta$ -Untereinheit der  $F_0F_1$ -ATP Synthase von *M. tuberculosis* ermöglichen sollten.

##### 4.2.1.1.1 Inaktivierung von *M. tuberculosis atpD*

Die Generierung des Suizidvektors für die Inaktivierung von *M. tuberculosis atpD* erfolgte wie in 3.2.16.4 beschrieben. Für die Analyse der Transformanden wurde die chromosomale DNA mit *XmnI* geschnitten und die Hybridierung mit einer *atpD*-DNA-Sonde durchgeführt. Bei dem gewählten Restriktionsverdau wurde ein Signal für *M. tuberculosis* Wildtyp mit der *atpD*-DNA-Sonde bei 6,5 kb, für einen 3' *single crossover* (sco) bei 7,4 kb und 8,7 kb, für einen 5' *single crossover* bei 9,4 kb und 6,5 kb erwartet (Abbildung 4-14). Nach drei unabhängigen Gegenselektionen von 3'- und 5' *atpD single crossover* Stämmen, konnte kein *M. tuberculosis atpD*Δ Knockout Stamm generiert werden. Die Rekombinationsfrequenz für die intramolekulare Rekombination liegt bei  $10^{-4}$  bis  $10^{-6}$  (Pavelka & Jacobs, 1999). Bakterienkolonien mit einem Antibiotikaresistenzphänotyp, der dem eines Knockout Stammes entspricht wurde bei den Gegenselektionen von *atpD sco* Stämmen mit der erwarteten Frequenz erreicht (Tabelle 4-1). Auf

Gegenselektionsmedium wurden mehrere Klone erhalten und genotypisch charakterisiert. Bei den drei unabhängigen Gegenselektionen wurden je acht Klone mit dem erwarteten Resistenzphänotyp getestet. Die genotypische Charakterisierung der insgesamt 24 getesteten Klone zeigte aber, dass kein zweites *crossover* Ereignis stattgefunden hatte. In allen Klonen waren weiterhin ein Wildtyp Allel und ein inaktives Allel vorhanden (Tabelle 4-1). Diese Ergebnisse lassen auf eine Essentialität des *atpD* Genes in *M. tuberculosis* schließen.



**Abbildung 4-14 Southern Blot Analyse von genomischer DNA *M. tuberculosis atpD***

Verdau der genomischen DNA mit *XmnI* und Hybridisierung mit der *atpD*-DNA-Sonde **Spur 1:** *M. tuberculosis* H37Rv; **Spur 2:** *M. tuberculosis atpD sco*; **Spur 3:** *M. tuberculosis atpD sco*, **Spur 4:** *M. tuberculosis atpD sco*.

**Tabelle 4-1 Rekombinationsfrequenz von *M. tuberculosis atpD sco***

	Rekombinationsfrequenz <i>M. tuberculosis sco atpD</i>	Anzahl positiver Klone nach Gegenselektion
1. Gegenselektion	$2 \times 10^{-6}$	0/8
2. Gegenselektion	$1,5 \times 10^{-4}$	0/8
3. Gegenselektion	$7 \times 10^{-6}$	0/8

#### 4.2.1.1.2 Expression und Lokalisation von *M. tuberculosis* AtpD in Mykobakterien

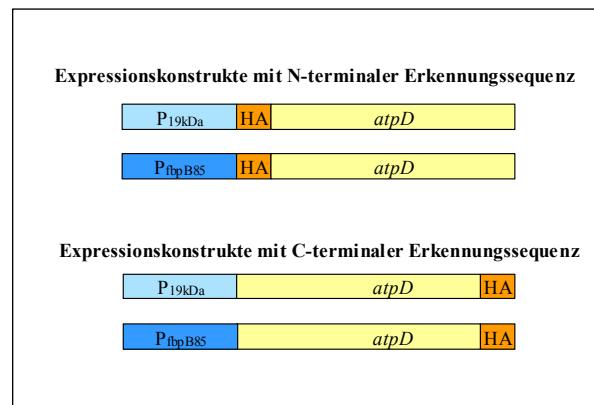
Neben der Generierung von Knockout Mutanten ist die Überexpression von Virulenzgenen eine Möglichkeit, die Bedeutung spezifischer Proteine für die Pathogenese von *M. tuberculosis* zu untersuchen.

Da in infizierten Makrophagen mykobakterielles AtpD nachgewiesen wurde (Ragno *et al.*, 2001), konnte vermutet werden, dass AtpD in die Wirtszelle sekretiert wird. Zur



Charakterisierung der AtpD-Funktion und des Sekretionsmechanismus wurden rekombinante Mykobakterien generiert werden, welche AtpD überexprimieren.

Das *atpD*-Gen ist das siebte Gen des Operons *atpBEFHAGDC*. Um die Transkription des isolierten *atpD*-Gens zu gewährleisten, wurde das *atpD*-Gen mit geeigneten Promotoren fusioniert. Als Promotoren wurden die mykobakteriellen Promotorregionen des 19kD-Proteins (169 bp 5' vom Startcodon) und des Antigen 85B-Proteins (*fbpB*) (363 bp 5' vom Startcodon) gewählt. Die Promotorregionen und das *atpD*-Gen wurden mittels PCR aus genomischer DNA von *M. tuberculosis* amplifiziert. Zur Erleichterung der Detektion wurde das *atpD*-Gen mit einer N- bzw. C-terminalen HA-Erkennungssequenz versehen (Abbildung 4-15).



**Abbildung 4-15 Schematische Darstellung der *atpD* Fusionskonstrukte**

Farbig unterlegt ist die Promotorregion des 19kD-Proteins (hellblau), des Antigens 85B (dunkelblau). Das *atpD*-Gen ist gelb, die N- bzw. C-terminalen Erkennungssequenz rot dargestellt.

Für die Klonierung in Mykobakterien stehen verschiedene Vektorsysteme zur Verfügung. Neben replikativen Vektoren, die in einer Kopienzahl von 3 bis 5 pro Genomäquivalent (*multi-copy*) vorkommen (Stover *et al.*, 1991), existieren integrative Vektoren, die an einer definierten Stelle in das Genom von Mykobakterien integrieren (Pena *et al.*, 1997). Da diese *single-copy* integrativen Vektoren ohne Selektionsdruck instabil sind, wurden auch stabil-integrative Vektoren mit deletiertem Integrase-Gen für die Klonierung verwendet. Diese zeichnen sich durch eine erhöhte Stabilität aus (Springer *et al.*, 2001).



Tabelle 4-2 Übersicht der generierten Expressionskonstrukte

Bezeichnung	Vektortyp	Promotor	Tag
pOLYG-P <sub>19kD</sub> -HA- <i>atpD</i>	replikativ	19kD	N
pOLYG-P <sub>19kDa</sub> - <i>atpD</i> -HA	replikativ	19kD	C
pOLYG-P <sub>fbpB85</sub> -HA- <i>atpD</i>	replikativ	fbpB85	N
pOLYG-P <sub>fbpB85</sub> - <i>atpD</i> -HA	replikativ	fbpB85	C
pMV361-hyg-P <sub>19kD</sub> -HA- <i>atpD</i>	integrativ	19kD	N
pMV361-hyg-P <sub>19kDa</sub> - <i>atpD</i> -HA	integrativ	19kD	C
pMV361-hyg-P <sub>fbpB85</sub> -HA- <i>atpD</i>	integrativ	fbpB85	N
pMV361-hyg-P <sub>fbpB85</sub> - <i>atpD</i> -HA	integrativ	fbpB85	C
pMV361 $\Delta$ int-hyg-P <sub>19kD</sub> -HA- <i>atpD</i>	integrativ	19kD	N
pMV361 $\Delta$ int-hyg-P <sub>19kDa</sub> - <i>atpD</i> -HA	integrativ	19kD	C
pMV361 $\Delta$ int-hyg-P <sub>fbpB85</sub> -HA- <i>atpD</i>	integrativ	fbpB85	N
pMV361 $\Delta$ int-hyg-P <sub>fbpB85</sub> - <i>atpD</i> -HA	integrativ	fbpB85	C

#### 4.2.1.1.2.1 Nachweis der Expression und Lokalisation von AtpD

Der Nachweis der Expression und der Lokalisation von AtpD wurde sowohl in *M. tuberculosis* als auch in *M. bovis* BCG durchgeführt. *M. bovis* BCG wird häufig als Modellorganismus für physiologische Untersuchungen verwendet, da *M. bovis* BCG sehr nahe mit *M. tuberculosis* verwandt ist und die Arbeiten nicht unter Bedingungen der Sicherheitsstufe 3 durchgeführt werden müssen.

Die in Tabelle 4-2 zusammengefassten generierten mykobakteriellen AtpD Expressionskonstrukte wurden in *M. bovis* BCG und *M. tuberculosis* transformiert und die Expression wurde durch Western Blot-Analyse untersucht. Dazu wurden Totalprotein-Extrakte der rekombinanten *M. bovis* BCG und *M. tuberculosis* Stämme gewonnen. Um die Sekretion der Fusionsproteine zu untersuchen, wurden die Kulturüberstände gewonnen und aufgetragen. Der Nachweis der Expression des HA-markierten Proteins erfolgte mit Hilfe eines HA-Antikörpers.

Die Expressions-Konstrukte des replikativen *multi-copy* Vektors pOLYG wurden in *M. bovis* BCG und *M. tuberculosis* durch Western Blotting analysiert. Sowohl N- wie auch C-terminal markierte Proteine (~53kD) unter Kontrolle des 19kD-Promotors respektive des fbpB85-Promotors konnten im Zelllysate von *M. bovis* BCG nachgewiesen werden. Im Zelllysate von *M. tuberculosis* konnte eine Expression von pOLYG-P<sub>19kD</sub>-HA-*atpD*, pOLYG-

P<sub>fbpB85</sub>-HA-atpD und pOLYG-P<sub>fbpB85</sub>-atpD-HA ebenfalls nachgewiesen werden, während es zu keiner Expression von pOLYG-P<sub>19kD</sub>-atpD-HA kam. Fusionskonstrukte unter der Kontrolle des fbpB85-Promotors zeigten in beiden mykobakteriellen Stämmen im Vergleich zum 19kD-Promotor ein etwas stärkeres Signal. Das N- bzw. das C-terminal-markierte AtpD-Fusionsprotein war immer Zell-assoziiert und konnte weder in den Kulturüberständen von *M. bovis* BCG noch in denen von *M. tuberculosis* nachgewiesen werden.

Die mit dem integrativen *single-copy* Vektor pMV361-hyg generierten Konstrukte wurden ebenfalls alle in *M. bovis* BCG untersucht. Hier konnte nur eine Expression des N-terminal markierten Proteins unter der Kontrolle des 19kD-Promotors nachgewiesen werden. Für die anderen Konstrukte (pMV361-hyg-P<sub>fbpB85</sub>-HA-atpD; pMV361-hyg-P<sub>fbpB85</sub>-atpD-HA und pMV361-hyg-P<sub>19kD</sub>-atpD-HA) konnte keine AtpD Expression gezeigt werden. Ein möglicher Grund für die fehlende Expression könnte der gewählte Vektor sein. Da die Kopienzahl des integrativen *single-copy* Vektors pMV361-hyg geringer ist als jene des pOLYG Vektors, könnte die Menge des exprimierten Proteins unterhalb der Nachweisgrenze liegen. In den Kulturüberständen von *M. bovis* BCG war kein rekombinantes AtpD nachweisbar.

Rekombinantes AtpD konnte weder im Zelllysat noch im Kulturüberstand von *M. tuberculosis* nachgewiesen werden, welche mit den Fusionskonstrukte pMV361-hyg-P<sub>19kD</sub>-HA-atpD und pMV361-hyg-P<sub>fbpB85</sub>-HA-atpD transformiert waren.

Untersuchungen mit dem stabil integrativen Vektor pMV361Δint-hyg wurden in *M. bovis* BCG durchgeführt. Es wurde die Expression des Proteins der Vektoren pMV361Δint-hyg P<sub>19kD</sub>-HA-atpD und pMV361Δint-hyg P<sub>fbpB85</sub>-HA-atpD untersucht. Hier ergaben sich ähnliche Ergebnisse wie bei den Untersuchungen mit den entsprechenden Konstrukten im pMV361-hyg Vektor. Nur die Expression des N-terminal markierten Proteins unter Kontrolle des 19kD-Promotors war möglich. Für das Konstrukt pMV361Δint-hyg-P<sub>fbpB85</sub>-atpD-HA konnte keine AtpD Expression gezeigt werden. Beide Fusionsproteine konnten im Kulturüberstand von *M. bovis* BCG nicht nachgewiesen werden.

Eine Zusammenstellung der getesteten Konstrukte auf Expression und Sekretion von rekombinaten atpD in *M. bovis* BCG und *M. tuberculosis* ist in Tabelle 4-3 dargestellt.

**Tabelle 4-3 Übersicht der in *M. bovis* BCG und *M. tuberculosis* getesteten Konstrukte**

Vektor	Expression			
	<i>M. bovis</i> BCG Zelllysate	<i>M. bovis</i> BCG Kulturüberstand	<i>M. tuberculosis</i> Zelllysate	<i>M. tuberculosis</i> Kulturüberstand
pOLYG-P <sub>19kDa</sub> -HA- <i>atpD</i>	+	-	+	-
pOLYG-P <sub>fbpB85</sub> -HA- <i>atpD</i>	++	-	+	-
pOLYG-P <sub>19kDa</sub> - <i>atpD</i> -HA	+	-	-	-
pOLYG-P <sub>fbpB85</sub> - <i>atpD</i> -HA	++	-	++	-
pMV361-hyg-P <sub>19kDa</sub> -HA- <i>atpD</i>	++	-	-	-
pMV361-hyg-P <sub>fbpB85</sub> -HA- <i>atpD</i>	-	-	-	-
pMV361-hyg-P <sub>19kDa</sub> - <i>atpD</i> -HA	-	-	n.u.	n.u.
pMV361-hyg-P <sub>fbpB85</sub> - <i>atpD</i> -HA	-	-	n.u.	n.u.
pMV361Δint-hyg-P <sub>19kDa</sub> -HA- <i>atpD</i>	+	-	n.u.	n.u.
pMV361Δint-hyg-P <sub>fbpB85</sub> -HA- <i>atpD</i>	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
pMV361Δint-hyg-P <sub>19kDa</sub> - <i>atpD</i> -HA	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
pMV361Δint-hyg-P <sub>fbpB85</sub> - <i>atpD</i> -HA	-	-	n.u.	n.u.

Legende: - kein Signal; + gutes Signal; ++ sehr gutes Signal; n.u. nicht untersucht

### 4.3 Oberflächenproteine als Virulenzfaktoren

Adhäsionsfaktoren sind für viele pathogene Bakterien wichtige Virulenzdeterminanten. Sie vermitteln u.a. das Anheften des Bakteriums an eukaryotische Zellen zu Beginn einer Infektion. Die Zellwand von Mykobakterien ist mit ihrer lipid- und glycanreichen äusseren Schicht sehr komplex aufgebaut (Glickman & Jacobs, 2001). Oberflächen-assoziierte Gruppen scheinen eine wichtige Rolle bei der initialen Interaktion mit der Wirtszelle zu spielen (Stokes *et al.*, 2004). Das molekulare Verständnis und die Bedeutung der Adhäsion für die Aufnahme in verschiedene Wirtszellen wie auch die Bedeutung der Rezeptor-vermittelten Phagozytose für den weiteren Infektionsverlauf sind bei weitem nicht vollständig.

#### 4.3.1 Das Adhäsिन HbhA

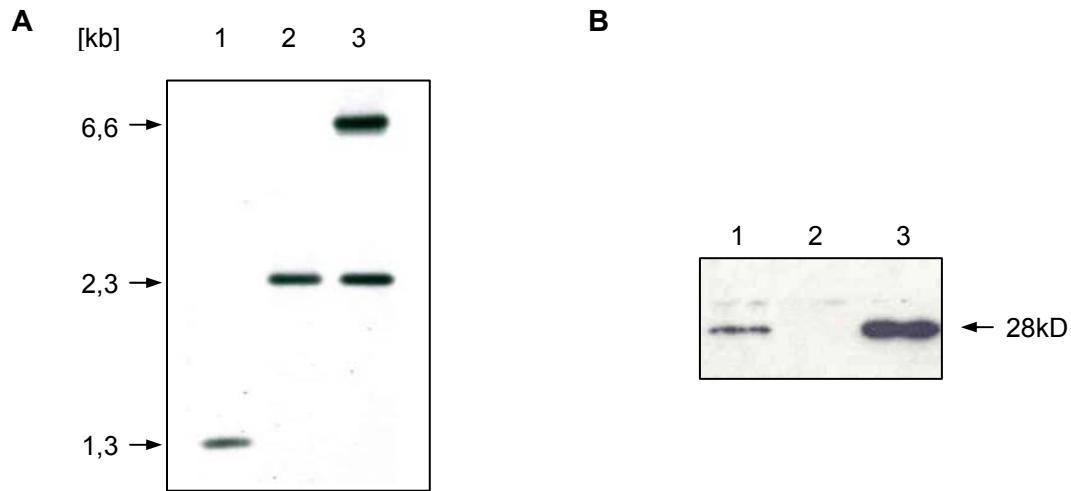
Neben der Lunge, die das am häufigsten betroffene Organ bei einer Tuberkulose ist, kann sich die Tuberkulose auch in anderen Organen manifestieren. Eine Infektion von weiteren Organen kann durch Streuung der Bakterien über das lymphatische System oder die Blutbahn erfolgen (Golden & Vikram, 2005; Kim *et al.*, 2006; Locht *et al.*, 2006; Raja, 2004). Die Adhäsion von Mykobakterien an Epithelzellen und der extrazellulären Matrix ist mit der Virulenz und extrapulmonaler Streuung assoziiert (Bermudez & Goodman, 1996; McDonough & Kress, 1995). Ein Protein, welches an der Adhäsion an Epithelzellen und der extrazellulären Matrix beschrieben wurde, ist das Heparin-bindende Hämagglutinin (HbhA). HbhA ist ein Oberflächenprotein von pathogenen Mykobakterien (Menozzi *et al.*, 1998; Menozzi *et al.*, 1996).

##### 4.3.1.1 Charakterisierung der *M. tuberculosis hbhA* Mutante

###### 4.3.1.1.1 Inaktivierung von *M. tuberculosis hbhA*

Die Inaktivierung von *M. tuberculosis hbhA* erfolgte mit dem Vektor ptrpA-1-rpsL-hbhA::aph wie in 3.2.16.5 beschrieben. Die Transformanten wurden mittels Southern Blot analysiert. Die chromosomale DNA wurde mit *MluI* geschnitten und die Hybridisierung mit einer *hbhA*-DNA-Sonde durchgeführt. Bei dem gewählten Restriktionsverdau wurde ein Signal für *M. tuberculosis* Wildtyp mit der *hbhA*-DNA-Sonde bei 1,3 kb erwartet und ein Signal der *hbhA* Knockout-Mutante (*hbhA*Δ) bei 2,3 kb. Der Banden-Shift von 1,3 kb beim Wildtyp zu 2,3 kb bei der Inaktivierung von *hbhA* ergibt sich durch Deletion eines 188 bp grossen DNA-Bereiches und die Insertion der 1,2 kb Kanamycin-Kassette. Der *M. tuberculosis* Stamm *hbhA*Δ wurde mit dem mykobakteriellen replikativen Vektor pOLYG-*hbhA* komplementiert (Abbildung 4-16 A). Die Deletion von *hbhA* führte zum

Verlust des HbhA Proteins. Nach der Transformation des *hbhA* Knockout Stammes *hbhAΔ* mit dem Plasmid pOLYG-*hbhA* konnte die Expression von HbhA wieder nachgewiesen werden (Abbildung 4-16 B).



**Abbildung 4-16 Genotypische Charakterisierung von *M. tuberculosis hbhAΔ***

**A** Southern Blot Analyse: **Spur 1:** *M. tuberculosis* H37Rv; **Spur 2:** *M. tuberculosis hbhAΔ*; **Spur 3:** *M. tuberculosis hbhAΔ* pOLYG-*hbhA*. Die genomische DNA von *M. tuberculosis* wurde mit *MluI* gespalten und die Hybridisierung mit der *hbhA*-DNA-Sonde durchgeführt.

**B** Western Blot Analyse : **Spur 1:** *M. tuberculosis* H37Rv; **Spur 2:** *M. tuberculosis hbhAΔ*; **Spur 3:** *M. tuberculosis hbhAΔ* pOLYG-*hbhA* mit einem anti-*hbhA* Antikörper.

#### 4.3.1.1.2 *In vivo* Charakterisierung von *M. tuberculosis hbhAΔ*

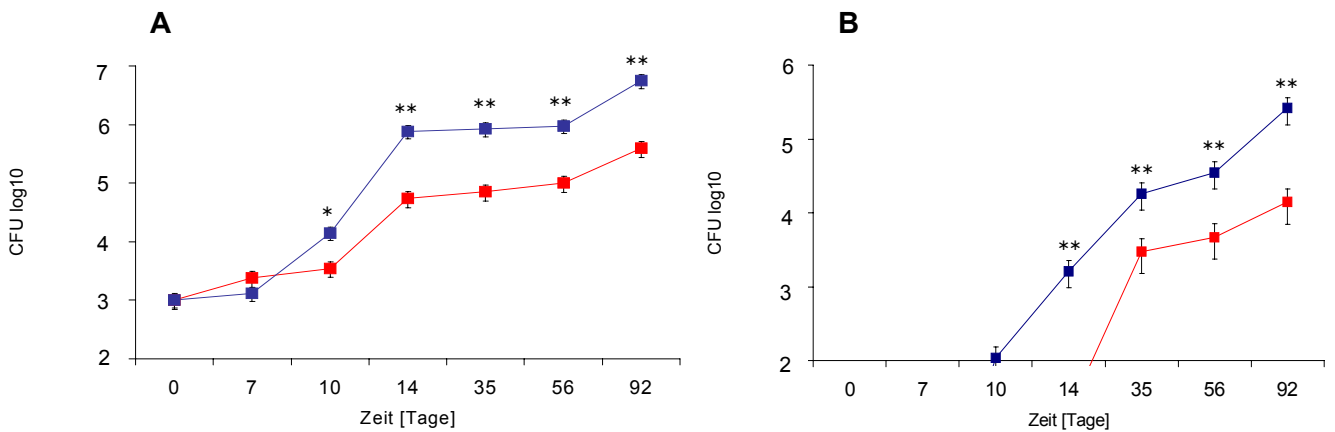
C57BL/6 Mäuse wurden in zwei etablierten Maus-Infektions-Modellen (Flynn, 2006), dem intratracheal (i.t.) und intravenös (i.v.), mit *M. tuberculosis* H37Rv und *M. tuberculosis hbhAΔ* infiziert. Der Verlauf der Infektion wurde über einen Zeitraum von 90 Tagen beobachtet und zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Anzahl der Mykobakterien in der Lunge sowie der Milz durch Bestimmung von CFU ermittelt. Beide Bakterienstämme vermehren sich, allerdings mit unterschiedlicher Rate.

Im intratrachealen Infektionsmodell erreichen die Bakterien direkt die Lunge und vermehren sich beträchtlich während der initialen akuten Infektionsphase. Von der Lunge aus streuen die Mykobakterien in weitere Organe, wie beispielsweise in die Milz oder die Leber. Nach intratrachealer Infektion von *M. tuberculosis* Wildtyp und *hbhAΔ* Knockout, Infektionsdosis  $10^3$ , war die Anzahl von Bakterien initial nach der Infektion in der Lunge nahezu gleich. Ab Tag 14 nach Infektion war die Anzahl der *hbhAΔ* Knockout Bakterien in der Lunge um  $\sim 1$  log geringer im Vergleich zum Wildtyp. Die an Tag 14 beobachtete Reduktion der CFU der *hbhAΔ* Mutanten war über den gesamten Beobachtungszeitraum

von 90 Tagen festzustellen (Abbildung 4-17). In der Milz war der *M. tuberculosis* Parentalstamm an Tag 10 nach Infektion detektierbar, während der *M. tuberculosis hbbAΔ* Knockout Stamm erst 14 Tage nach Infektion in der Milz nachgewiesen werden konnte. Zu diesem Zeitpunkt entsprach die Anzahl der *hbbAΔ* Bakterien in der Lunge der Anzahl der Wildtyp Bakterien an Tag 10. Ähnlich wie in der Lunge war auch in der Milz eine Reduktion der CFU des *hbbAΔ* Knockout Stammes im Vergleich zum *M. tuberculosis* Parentalstamm zu beobachten. Die verringerte Anzahl CFU des *hbbAΔ* Knockouts wurde über den gesamten Beobachtungszeitraum festgestellt (Abbildung 4-17).

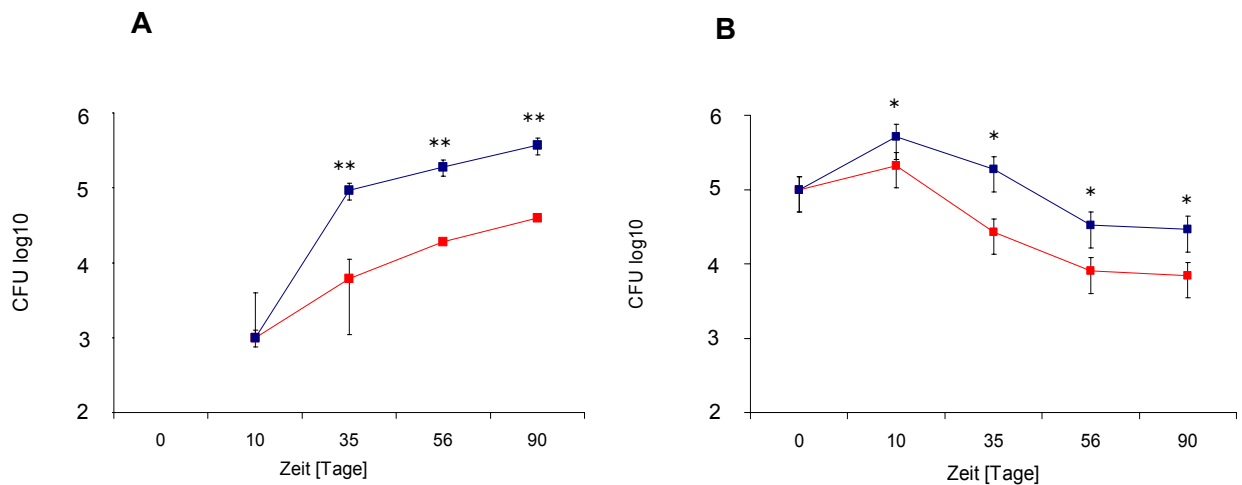
Im intravenösen Infektionsmodell wird eine hohe Bakteriendosis in die Schwanzvene der Maus injiziert. Bei diesem Infektionsmodell erreicht die Mehrheit der injizierten Bakterien die Milz und nur eine Minderheit der Bakterien gelangen zunächst in die Lunge (North *et al.*, 1999). Nach Infektion über die intravenöse Route nimmt die Anzahl der Mykobakterien in der Milz ab (Cardona *et al.*, 1999), während sich die Mykobakterien in der Lunge kontinuierlich vermehren, bis es durch eine starke Lungenpathologie zum Tod der Mäuse kommt (Flynn & Chan, 2001). Nach intravenöser Infektion mit dem *M. tuberculosis* Parentalstamm H37Rv und dem *hbbAΔ* Knockout Stamm (Infektionsdosis  $10^5$ ) war die Anzahl von Bakterien initial nach Infektion in der Lunge nahezu gleich. Im weiteren Verlauf der Infektion war in der Lunge eine Reduktion der CFU von *M. tuberculosis hbbAΔ* im Vergleich zu *M. tuberculosis* H37Rv zu beobachten. Die Reduktion um 1 log der Anzahl der CFU war ab Tag 35 über den gesamten Beobachtungszeitraum von 90 Tagen festzustellen (Abbildung 4-18). Eine Reduktion der Anzahl koloniebildender Einheiten wurde sowohl für den Parentalstamm als auch für den *hbbA* Knockout Stamm beobachtet, im Vergleich zum Wildtyp war die Anzahl CFU der *hbbA* Knockout Mutante in der Milz (ab Tag 35) jedoch vermindert (Abbildung 4-18).

Untersuchungen zum Langzeitüberleben von C57BL/6 nach i.v. Infektion über einen Zeitraum von 250 Tagen ergaben, dass die mittlere Überlebenszeit (MST) von *M. tuberculosis hbbAΔ* infizierten Mäusen mit  $189 \pm 27$  Tagen höher liegt als nach einer Infektion mit *M. tuberculosis* H37Rv ( $126 \pm 20$  d). Im Vergleich zum Wildtyp H37Rv, ist somit die MST bei *M. tuberculosis hbbAΔ* um den Faktor  $\sim 1,5$  höher (Abbildung 4-19).



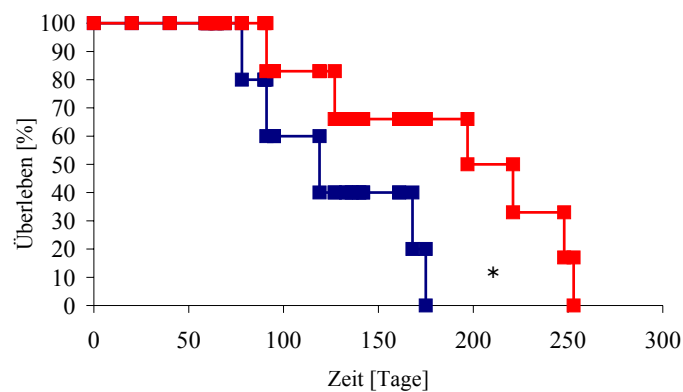
**Abbildung 4-17** Darstellung des *in vivo* Infektionsverlauf von *M. tuberculosis* H37Rv und *M. tuberculosis hbhAΔ* in C57BL/6 Mäusen nach intratrachealer Infektion

Bakterielle Anzahl in **A** Lunge, **B** Milz von 4 bis 5 C57BL/6 Mäusen nach intratrachealer Infektion mit  $10^3$  *M. tuberculosis* H37Rv (blau) und *M. tuberculosis hbhAΔ* (rot). Darstellung von Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. T-Test: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .



**Abbildung 4-18** Darstellung des *in vivo* Infektionsverlauf von *M. tuberculosis* H37Rv und *M. tuberculosis hbhAΔ* in C57BL/6 Mäusen nach intravenöser Infektion

Bakterielle Anzahl in **A** Lunge, **B** Milz von 5 bis 6 C57BL/6 Mäusen nach intravenöser Infektion mit  $10^5$  *M. tuberculosis* H37Rv (blau) und *M. tuberculosis hbhAΔ* (rot). Darstellung von Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. T-Test: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .



**Abbildung 4-19 Darstellung des Langzeitüberlebens von C57BL/6 Mäusen nach intravenöser Infektion mit *M. tuberculosis* H37Rv und *M. tuberculosis hbhAΔ***

Prozentualer Anteil an überlebenden Mäusen nach intravenöser Infektion mit *M. tuberculosis* H37Rv (blau) und *M. tuberculosis hbhAΔ* (rot) über einen Zeitraum von 250 Tagen. Gohan's criterion, \*  $p < 0,05$ .

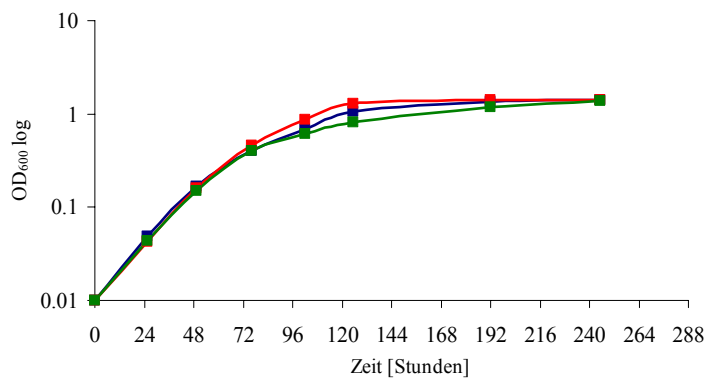
#### 4.3.1.1.3 Untersuchungen zur Virulenzattenuation von *M. tuberculosis hbhAΔ*

Mögliche Ursachen für die Virulenzattenuation der *hbhAΔ* Knockout Mutante sind 1) eine generelle verminderte Fitness, 2) eine verminderte Aufnahme in spezifische Wirtszellen und damit der Ausschluss von einer intrazellulären Vermehrung und/oder 3) eine vermindertes intrazelluläres Überleben/Vermehrung. Zur Unterscheidung dieser drei Möglichkeiten wurde das *in vitro* Wachstum der *hbhAΔ* Mutante, die Phagozytose der Mutante durch verschiedene Wirtszellen und die intrazelluläre Vermehrung untersucht.

##### 4.3.1.1.3.1 *In vitro* Charakterisierung von *M. tuberculosis hbhAΔ*

Das *in vitro* Wachstum von *M. tuberculosis hbhAΔ* wurde im Vergleich zu *M. tuberculosis* Wildtyp und komplementiertem Knockout in Middlebrook 7H9 OADC Medium untersucht. Es wurde eine maximale OD<sub>600</sub> von ~1,5 unter den gewählten Bedingungen erreicht (Abbildung 4-20); Wachstum und Koloniemorphologie der Stämme auf 7H10 Agarplatten waren ebenfalls identisch.





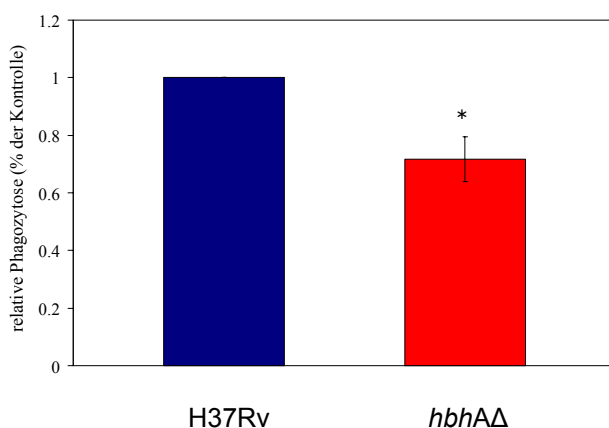
**Abbildung 4-20 Darstellung der Wachstumskurve von *M. tuberculosis* H37Rv, *M. tuberculosis* *hbhA*Δ und *M. tuberculosis* *hbhA*Δ Komplementation**

*In vitro* Wachstums von *M. tuberculosis* H37Rv (blau), *M. tuberculosis* *hbhA*Δ (rot) und *M. tuberculosis* *hbhA*Δ Komplementation (grün) in Middlebrook 7H9 in einem Rollflaschen System. Darstellung eines Triplikat-Mittelwertes  $\pm$  Standardabweichung ( $<0,02$ ).

#### 4.3.1.1.3.2 Phagozytose von *M. tuberculosis* *hbhA*Δ

Als Oberflächenprotein ist HbhA möglicherweise an der Phagozytose von *M. tuberculosis* beteiligt. Durch den Vergleich der Phagozytoseraten (prozentualer Anteil des Bakterieninokulums, welcher von den Zellen aufgenommen wurde) von *M. tuberculosis* Wildtyp vs. *M. tuberculosis* *hbhA*Δ Knockout Mutante in primären Zellen (Knochenmarkmakrophagen), neutrophile Granulozyten, Peritonealmakrophagen und Lungenmakrophagen, wurde der Einfluss von HbhA auf die Phagozytose durch verschiedene Wirtszellen untersucht.

In Abbildung 4-21 ist die relative Phagozytoserate durch professionelle Phagozyten der *M. tuberculosis* Stämme dargestellt. Im Vergleich zu *M. tuberculosis* Wildtyp zeigt die *M. tuberculosis* *hbhA*Δ Knockout Mutante in BMDM eine reduzierte Phagozytoserate. Die Phagozytoserate des Wildtyps ist um ca. 30% höher als die des *hbhA*Δ Knockout Stammes.



**Abbildung 4-21 Darstellung der relativen Phagozytoserate von *M. tuberculosis* H37Rv und *M. tuberculosis* *hbhA*Δ in BMDM**

Die Phagozytose von H37Rv Wildtyp wurde 1 gesetzt. Phagozytoserate: *M. tuberculosis* H37Rv (blau) und *M. tuberculosis* *hbhA*Δ (rot) in BMDM (MOI 10). Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von 7 unabhängigen Versuchen. T-Test: \*  $p < 0,01$ .

Um die Beteiligung des Adhäsins bei der Aufnahme durch verschiedene Zelltypen zu untersuchen, wurde die Phagozytoserate (prozentualer Anteil an Zellen, die mindestens ein Bakterium phagozytiert haben) sowie die phagozytische Anzahl (Anzahl Bakterien pro 100 Zellen) von peritonealen neutrophilen Granulozyten, peritonealen Makrophagen und Lungenmakrophagen bestimmt.

C57BL/6 Mäuse wurden intraperitoneal mit dem *M. tuberculosis* Wildtyp, *hbhAΔ* Knockout Stamm und komplementierter *hbhAΔ* Knockout Mutante (*hbhAΔ*-pOLYG-*hbhA*) infiziert. 2 h nach der Infektion erfolgte die Tötung der Mäuse und die Isolation peritonealer neutrophilen Granulozyten und Makrophagen. Anschließend wurde die Phagozytoserate sowie die phagozytische Anzahl durch Ziehl-Neelsen Färbung der Bakterien bestimmt. In peritonealen neutrophilen Granulozyten war die Phagozytoserate sowie die phagozytische Anzahl von *M. tuberculosis hbhAΔ* Stamm im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduziert. Die Phagozytoserate des Wildtyps durch neutrophile Granulozyten liegt ungefähr doppelt so hoch wie die von *M. tuberculosis hbhAΔ* (50,3% vs. 28,2%). Ähnliches war in peritonealen Makrophagen zu beobachten. Auch in diesen Zellen wurden die Wildtypbakterien ungefähr 1,5 fach besser aufgenommen als die *hbhAΔ* Knockout Mutante (Phagozytoserate 49,7% vs. 30,7%) (Tabelle 4-4). Durch Komplementation von *M. tuberculosis hbhAΔ* mit dem Vektor pOLYG-*hbhA* wurde der Phagozytosephänotyp in beiden Zelltypen grösstenteils komplementiert (Tabelle 4-4).

Für weitere Versuche wurden aus C57BL/6 isolierte Lungenmakrophagen *in vitro* mit dem Wildtyp, der *hbhAΔ* Knockout Mutante und der komplementierten Mutante infiziert. In den Lungenmakrophagen war die *in vitro* Phagozytoserate (26,0% vs. 48,5%) und die phagozytische Anzahl von *M. tuberculosis hbhAΔ* Stamm im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls signifikant reduziert (Tabelle 4-4).

**Tabelle 4-4 Phagozytoserate und phagozytischer Anteil**

(A) *In vivo*\* Phagozytose und phagozytischer Anteil in peritonealen neutrophilen Granulozyten und peritonealen Makrophagen.

(B) *Ex-vivo*\*\* Phagozytose und phagozytischer Anteil in Lungenmakrophagen.

	H37Rv	<i>hbhAΔ</i>	<i>hbhA+</i>	P-Wert (T-Test)
<b>A</b>				
Phagozytoserate <sup>a</sup>				
peritoneale Neutrophile	50,3 ± 3,3	28,2 ± 0,7	40,0 ± 1,4	< 0,0001
peritoneale Makrophagen	49,7 ± 0,4	30,7 ± 1,3	43,0 ± 0,7	< 0,0001
Phagozytische Anzahl <sup>b</sup>				
peritoneale Neutrophile	121 ± 6	48 ± 3	78 ± 2	< 0,001
peritoneale Makrophagen	186 ± 8	95 ± 6	152 ± 8	< 0,001
<b>B</b>				
Phagozytoserate <sup>a</sup>				
Lungenmakrophagen	48,5 ± 1,9	26,0 ± 1,3	35,5 ± 1,2	< 0,0001
Phagozytische Anzahl <sup>b</sup>				
Lungenmakrophagen	343 ± 32	121 ± 7	208 ± 25	< 0,001

a Prozentualer Anteil an Zellen, die mindestens ein Bakterium phagozytiert haben

b Anzahl Bakterien in 100 Zellen

\* *In vivo* Phagozytose 2 h nach Infektion mit 10<sup>8</sup> CFU/Maus

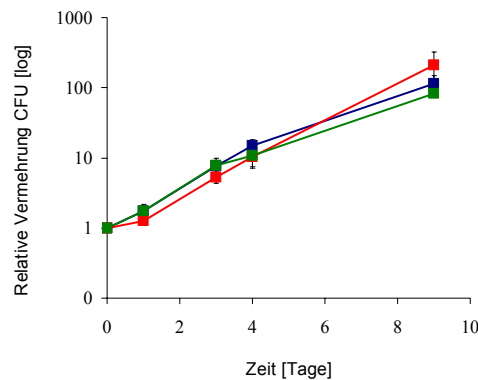
\*\* *Ex vivo* Phagozytose über Nacht mit einer MOI Bakterien/Zellen von 5

P für Wildtyp H37Rv vs. *hbhAΔ*

#### 4.3.1.1.3.3 Intrazelluläres Überleben von *M. tuberculosis hbhAΔ* in BMDM

Die intrazelluläre Vermehrung des *M. tuberculosis* Parentalstammes, des *M. tuberculosis hbhAΔ* Stammes und des komplementierten *hbhAΔ* Stammes wurde in primären Makrophagen untersucht. Um die Vermehrungsrate der untersuchten *M. tuberculosis* Stämme vergleichen zu können, wurde die relative Vermehrung betrachtet. Die verminderte Aufnahme der *M. tuberculosis hbhAΔ* Knockout Mutante hat somit keinen Einfluss auf die Auswertung.

Die drei Stämme zeigten jeweils eine Vermehrungsrate um den Faktor 100. Der *hbhAΔ* Knockout Stamm zeigt in den primären Makrophagen eine ähnliche Vermehrung wie der Wildtyp und die komplementierte Knockout Mutante (Abbildung 4-22).



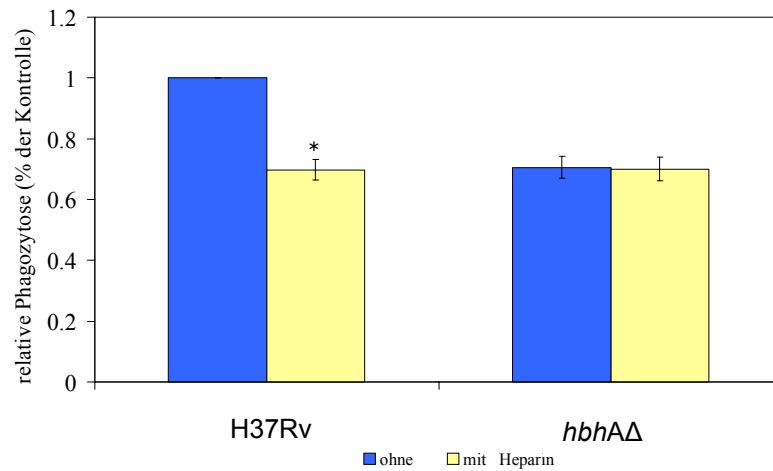
**Abbildung 4-22 Darstellung der relativen Vermehrungsrate von *M. tuberculosis* H37Rv, *M. tuberculosis hbhAΔ* und *M. tuberculosis* Komplementation *hbhAΔ* in BMDM**

Relative Anzahl intrazellulärer Bakterien nach Infektion von BMDM von C57BL/6 Mäusen mit *M. tuberculosis* H37Rv (blau), *M. tuberculosis hbhAΔ* (rot) und *M. tuberculosis* Komplementation *hbhAΔ* über einen Zeitraum von 9 Tagen. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen.

#### 4.3.1.1.3.4 Hemmung der Phagozytose von *M. tuberculosis* H37Rv in BMDM durch Heparin

Eine verringerte Phagozytose von *M. tuberculosis hbhAΔ* durch primäre Makrophagen wird durch den Verlust von HbhA hervorgerufen. Eine Überprüfung der Bedeutung von HbhA als Heparin-bindendes Protein für die Phagozytose kann durch Zugabe des Kompetitors Heparin erfolgen. Sollte die Heparinbindungsaktivität von HbhA für die Phagozytose wichtig sein, sollte durch Zugabe von Heparin zum *M. tuberculosis* Wildtyp die Phagozytoserate deutlich verringert werden, während die Phagozytoserate der *hbhAΔ* Knockout Mutante nur unwesentlich oder gar nicht beeinflusst werden sollte.

In Abbildung 4-23 ist der Effekt von exogenem Heparin auf die Phagozytoserate von *M. tuberculosis* Wildtyp und *M. tuberculosis hbhAΔ* durch BMDM dargestellt. Die Zugabe von 10  $\mu\text{g/ml}$  Heparin zu der Bakteriensuspension reduzierte die Phagozytoserate des Wildtyps auf das Niveau der *hbhAΔ* Knockout Mutante, während das exogene Heparin keinen Einfluss auf die Phagozytoserate des *M. tuberculosis hbhAΔ* Knockouts hatte.



**Abbildung 4-23 Darstellung des Einflusses von Heparin auf die Phagozytoserate von BMDM**

Relative Phagozytoserate von *M. tuberculosis* H37Rv und *M. tuberculosis hbhA*Δ in BMDM mit (blau) und ohne (gelb) Zugabe von 10 µg/ml Heparin. Mittelwert ± Standardabweichung von 3 unabhängigen Versuchen. Die Phagozytoserate des Wildtyps in Abwesenheit von Heparin wurde gleich 1 gesetzt. T-Test: \*  $p < 0,01$ .

## 5 Diskussion

### 5.1 Virulenzfaktoren von *M. tuberculosis*

Der Begriff „Virulenz“ leitet sich vom lateinischen Begriff *virulentus* (giftig) ab und ist definiert als Ausmass, in dem ein Erreger in einem empfänglichen Wirt eine Erkrankung (Schaden) hervorrufen kann. Virulenz ist nicht nur in Abhängigkeit vom Erreger zu betrachten, sondern stellt ein komplexes, dynamisches und veränderbares Phänomen dar, welches auch den Wirt als Variable beinhaltet (Casadevall & Pirofski, 1999). Für die Ausprägung der Virulenz eines Mikroorganismus müssen bestimmte mikrobielle Charakteristika, so genannte Virulenzfaktoren, exprimiert werden. Entsprechend werden Virulenzfaktoren als diejenigen Bestandteile eines Pathogens angesehen, welche dem Wirt Schaden zufügen, und deren Entfernung oder Inaktivierung zu einer Beeinträchtigung der Virulenz führt (Casadevall & Pirofski, 2001). Wichtige Virulenzfaktoren sind z.B. Kapseln, Toxine, Adhäsine und Proteasen (Finlay & Falkow, 1997). Aber auch Faktoren, welche die Wirtszellphagozytose hemmen oder den bakteriellen Stoffwechsel verändern, z.B. an intrazelluläre Bedingungen anpassen, können als Virulenzfaktoren wirken.

In *M. tuberculosis* scheinen klassische Virulenzfaktoren, wie Toxine, zu fehlen (Desjardin & Schlesinger, 2000). In den letzten Jahren wurden verschiedene Gene identifiziert, welche zur Pathogenität und Virulenz von *M. tuberculosis* beitragen (Hernandez Pando *et al.*, 2006). Diese Gene und Genprodukte können in verschiedene Virulenzgruppen, entsprechend ihrer bekannten oder vorausgesagten Funktion, eingeteilt werden. So wird beispielsweise in Sekretionsproteine, Zelloberflächenkomponenten und regulatorische Prozesse unterschieden (Smith, 2003). Insgesamt sind mindestens 200 Gene für die volle Ausprägung der *M. tuberculosis* Virulenz notwendig (Sasseti & Rubin, 2003), wobei die Funktion vieler dieser Gene noch nicht bekannt ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden Gene unterschiedlicher Virulenzgruppen untersucht: mit den Adenylatcyclasen Rv1264 und Rv1625c (*cya*) wurden mögliche regulatorische Einflüsse des cAMP und der Adenylatcyclasen auf die Virulenz überprüft; AtpD und HbhA wurden als Vertreter sekretorischer Proteine ausgewählt.

### 5.1.1 Adenylatcyclasen und deren Produkt cAMP

Adenylatcyclasen (AC) synthetisieren aus ATP den universellen *second messenger* cAMP (zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat). cAMP ist als Signalmolekül in eine Vielzahl von regulatorischen Prozessen des Wirtes aber auch verschiedener Erreger involviert (Lory *et al.*, 2004). Bei *Vibrio vulnificus* ist cAMP beispielsweise an der globalen Genregulation beteiligt (Kim *et al.*, 2005), während in *Yersinia enterocolitica* eine AC für die Expression von Virulenzgenen notwendig ist (Petersen & Young, 2002). Bei der Wirt-Pathogen Interaktion können wirtseigene Adenylatcyclasen z. B. durch Toxine zur ständigen Synthese von cAMP stimuliert werden (CyaA von *Bordetella pertussis* (Guo *et al.*, 2005a)) oder die Toxine selber besitzen Adenylatcyclasen Aktivität (Ödemfaktor; *Bacillus anthracis* (Abrami *et al.*, 2005)).

Die bakterielle Signaltransduktion ist ein komplexes System, in das viele verschiedene Strukturen und Signalsysteme involviert sind. So müssen beispielsweise eine Vielzahl von exogenen oder endogenen Veränderungen wahrgenommen werden wie Schwankungen des Sauerstoffgehalts, pH-Werts oder Nährstoffangebots. Integration und Reaktion auf diese Signale führt z.B. zur Anpassung des Metabolismus, der Physiologie und/oder des Verhaltens (Galperin, 2004).

Die Rolle des cAMPs bei der Katabolitrepression wurde in *E. coli* sehr genau charakterisiert und gilt als Modell für die Genregulation durch cAMP in Prokaryoten (Botsford & Harman, 1992; Lawson *et al.*, 2004). In Bakterien beeinflusst cAMP verschiedene zelluläre Funktionen wie Osmoregulation, Sporulation und Phototaxis (Baker & Kelly, 2004; Derouaux *et al.*, 2004; Kimura *et al.*, 2005; Kimura *et al.*, 2002; Susstrunk *et al.*, 1998a). Eine Regulation von Virulenzfaktoren durch cAMP konnte ebenfalls gezeigt werden (Smith *et al.*, 2004; Wolfgang *et al.*, 2003).

Das Genom von *M. tuberculosis* H37Rv enthält 15 Gene, welche für Adenylatcyclasen der Klasse III kodieren (Cole *et al.*, 1998; McCue *et al.*, 2000). Diese hohe Anzahl lässt vermuten, dass das Signalmolekül cAMP eine wichtige Rolle bei der Pathogenität von Mykobakterien spielt. Als universeller Botenstoff könnte cAMP die eukaryotische Signaltransduktion stören, oder aber die eigene bakterielle Genexpression beeinflussen. Die Vermutung, dass in Folge einer *M. tuberculosis* Infektion synthetisiertes cAMP einen Einfluss auf das eukaryotische Signalsystem hat, wird durch eine Studie von Lowrie und Kollegen unterstützt (Lowrie *et al.*, 1975). Nach Infektion von Makrophagen mit lebenden *Mycobacterium microti* wurde ein erhöhter intrazellulärer cAMP-Spiegel gemessen. Eine Erhöhung des cAMP-Spiegels nach der Infektion mit abgetötetem *M. microti* war jedoch

nicht festzustellen (Lowrie *et al.*, 1975). Diese Erhöhung der cAMP Konzentration korreliert mit einer verminderten Phagosom-Lysosom Fusion (Lowrie *et al.*, 1975; Lowrie *et al.*, 1979). Dieser Befund kann dahingehend interpretiert werden, dass mykobakterielle AC direkt cAMP synthetisieren. Alternativ könnten durch lebende, nicht aber durch tote Mykobakterien wirtseigene AC aktiviert werden. Für viele der 15 annotierten Adenylatcyclasen von *M. tuberculosis* konnte eine cAMP-synthetisierende Aktivität nachgewiesen werden (Guo *et al.*, 2001; Linder *et al.*, 2002; Linder *et al.*, 2004; Shenoy & Visweswariah, 2006; Shenoy *et al.*, 2005; Sinha *et al.*, 2005). Über die Funktion von cAMP in Mykobakterien ist jedoch noch wenig bekannt, obwohl es sowohl bei pathogenen als auch bei nicht-pathogenen Mykobakterien nachgewiesen werden konnte (Padh & Venkitasubramanian, 1976a; Padh & Venkitasubramanian, 1976b). Kürzlich konnte ein Einfluss von cAMP auf die mykobakterielle Genregulation nachgewiesen werden. Bei Sauerstoffmangel ist exogenes cAMP an der Genregulation von mindestens 15 Genen in Mykobakterien beteiligt (Gazdik & McDonough, 2005). Weitere Hinweise auf eine Beteiligung von cAMP ergeben sich auch aus der Charakterisierung des Genes Rv3676 (*crp<sub>Mt</sub>*) von *M. tuberculosis*, einem cAMP Rezeptorprotein. Die Deletion des Genes Rv3676 resultiert in einer *in vivo* Virulenzattenuation und in einer verminderten Vermehrung in Maus-Makrophagen (Rickman *et al.*, 2005). Das Protein CRP<sub>Mt</sub> wird als ein cAMP abhängiger Transkriptionsfaktor von *M. tuberculosis* angesehen. Dabei bildet Crp<sub>Mt</sub> mit cAMP und DNA einen ternären Komplex. Mehr als 100 Gene werden durch das Crp<sub>Mt</sub> Regulon reguliert (Bai *et al.*, 2005). Unter den Genen des Crp<sub>Mt</sub> Regulon befindetet u.a. auch *rpfa* (Rv0867c), welches in die Regulation von Persistenz und Reaktivierung der Tuberkulose involviert sein könnte (Bai *et al.*, 2005; Rickman *et al.*, 2005). Beim Vergleichen von *M. tuberculosis* Crp mit dem orthologen Gen des attenuierten Stammes *M. bovis* BCG wurden Punktmutationen innerhalb des BCG Genes gefunden und es wird vermutet, das CRP und damit auch cAMP hier kein globaler Genregulator ist und damit Gene, welche für ein *in vivo* Überleben und die Persistenz notwendig sind, nicht exprimiert werden (Spreadbury *et al.*, 2005). Unterschiede zwischen dem virulenten *M. tuberculosis* und dem Impfstamm *M. bovis* BCG sind somit mit Veränderungen des cAMP Regulons assoziiert.

Auch Beobachtungen in anderen Bakterien der Ordnung Actinomycetales weisen auf die Bedeutung des cAMP Stoffwechsels für die Physiologie dieser Gruppe von Bakterien im Allgemeinen und die Bedeutung von Rv1264 im besondern hin. Die physiologischen Untersuchungen einer *S. coelicolor* Mutante (Susstrunk *et al.*, 1998a) und die biochemische Charakterisierung des *M. tuberculosis* Homologes Rv1264 (Tews *et al.*, 2005), weisen auf eine zentrale Bedeutung dieser AC unter sauren Bedingungen hin. Auf



dem durch das Wachstum angesäuertem Medium kommt es bei der *S. coelicolor cya* Mutante zu einem Wachstums- und Sporulationsende. Dieser beobachtete Effekt wird auf das Fehlen von cAMP, welches durch Cya synthetisiert wird, zurückgeführt (Susstrunk *et al.*, 1998b). In einer Arbeit von Tews und Kollegen konnte für die AC, kodiert durch den ORF Rv1264, gezeigt werden, dass der N-Terminus als pH Sensor fungiert und die höchste enzymatische Aktivität des Holoenzym bei einem pH-Wert von 6,0 liegt (Tews *et al.*, 2005). Durch die Aktivierung von Rv1264 könnte *M. tuberculosis* die eigene Genexpression regulieren oder aber die weitere Reifung des Phagosoms verhindern in dem es Wirtsfaktoren reguliert, welche an der Phagosomenreifung beteiligt sind. *M. tuberculosis* ist ein intrazelluläres Pathogen welches die Phagosomenreifung auf der Stufe eines frühen Endosoms inhibiert. Dieses frühe Endosom ist charakterisiert durch einen pH-Wert von ca. 6,3. Die pH-Sensitivität von Rv1264 qualifiziert diese AC für einen bakteriellen Sensor von *M. tuberculosis* und somit zur Wahrnehmung des intraphagosomalen pH-Wertes.

Die hohe Aktivität von Rv1625c (*cya*) im heterologen Expressionssystem sowie eine Interaktion mit Adenylatcyclasen von Säugern, ließ vermuten, das Cya eine Rolle bei der Wirt-Pathogen Interaktion spielen könnte.

In der vorliegenden Arbeit wurden die zwei Adenylatcyclasen Rv1264 und *cya* von *M. tuberculosis* H37Rv in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Infektionsmodellen untersucht.

### **5.1.2 Charakterisierung der Adenylatcyclase Mutanten**

Um die Hypothese von Rv1264 als bakteriellen Sensor in *M. tuberculosis* zu untersuchen, wurde eine *M. tuberculosis* Rv1264 Knockout Mutante generiert, bezeichnet mit Rv1264Δ. Die Mutante wurde in *in vitro* und *in vivo* Infektionsmodellen untersucht. Der Rv1264Δ Stamm zeigte *in vitro* bei Wachstum im Flüssigkulturmedium Middlebrook 7H9 als auch auf dem Festmedium 7H10 ein zum Parentalstamm H37Rv identisches Verhalten. Bei den *in vivo* Untersuchungen im aerogenen, akuten Maus-Infektions-Modell konnten keine Unterschiede bezüglich der Virulenz (CFU, Organpathologie) zum Wildtyp *M. tuberculosis* beobachtet werden. Der *M. tuberculosis* Rv1264 Knockout Stamm ist nicht attenuiert. Die Inaktivierung von Rv1264 beeinflusst den akuten Verlauf einer mykobakteriellen Infektion somit nicht.

Um eine mögliche Beteiligung von *cya* bei der Virulenz von *M. tuberculosis* zu untersuchen, wurde analog eine *M. tuberculosis cya* Knockout Mutante generiert (*cya*Δ).

Dieser Stamm wurde ebenfalls in *in vitro* und *in vivo* Infektionsmodellen untersucht. Der *cyaΔ* Knockout Stamm zeigte ein identisches Wachstum im Vergleich zum Parentalstamm H37Rv, sowohl in Flüssigkulturmedium als auch auf Festmedium. Im aerogenen, akuten Maus-Infektions-Modell fand sich kein Unterschied im Verlauf der mykobakteriellen Infektion zwischen *cyaΔ* und dem Parentalstamm.

Nachdem die zunächst generierten *M. tuberculosis* Rv1264Δ und *cyaΔ* Stämme keine Attenuation im Vergleich zum Parentalstamm zeigten, wurde unter der Annahme einer Redundanz von Rv1264 und *cya* ein Adenylatcyclase-Doppel-Knockout Rv1264/*cya* generiert (Rv1264Δ/*cyaΔ*). Die Rv1264Δ/*cyaΔ* Doppel-Knockout-Mutante zeigte identisches *in vitro* Wachstum sowohl im Vergleich zum Parentalstamm H37Rv wie auch zu den Einzel-Knockout-Mutanten Rv1264Δ und *cyaΔ*. Die zusätzlich durchgeführten Zellkultur- und Maus-Infektions-Modelle zeigten, dass der generierte Doppel-Knockout analog der Einzel-Knockouts nicht attenuiert ist und die gleichzeitige Inaktivierung von Rv1264 und *cya* den Verlauf der Infektion nicht beeinflusst. Die Untersuchungen zeigen somit, dass weder Rv1264 noch *cya* weder einzeln noch in Kombination für das Überleben von *M. tuberculosis* notwendig sind (Dittrich *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2005b).

Die mit dem Einzel- und der Doppel-Mutante erhobenen *in vivo* Befunde lassen jedoch noch keine endgültigen Rückschlüsse auf die Bedeutung von cAMP bei der Virulenz von *M. tuberculosis* zu, da noch weitere Adenylatcyclasen im Genom von *M. tuberculosis* kodiert sind. Diese könnten gegebenenfalls eine hinreichende Menge an cAMP synthetisieren, um die für die Virulenzausprägung notwendige Gene zu regulieren oder aber auf das eukaryotische System einzuwirken. Um die Bedeutung der verschiedenen Adenylatcyclasen im Genom von *M. tuberculosis* weiter aufzuklären, ist die Generierung weiterer Adenylatcyclasen Knockout Stämme notwendig. Die Einzel-Knockout Mutanten insbesondere aber die Doppel-Knockout Mutante könnte sich als wichtiges Werkzeug für weitere Untersuchungen zur Bedeutung des mykobakteriellen cAMP Stoffwechsels eignen. Das Multiple-Knockout-Mutanten wichtige Werkzeuge bei der Untersuchung von redundanten Genen sind und damit Auskunft über Virulenzfaktoren geben können, wurde in einer kürzlich veröffentlichten Studie über die *rpf* ähnlichen Gene von *M. tuberculosis* deutlich (Downing *et al.*, 2005). Die Deletion jedes einzelnen der fünf *rpf* Gene (A-E) von *M. tuberculosis* hatte keinen Einfluss auf das Wachstum oder der Überleben des Pathogens (Downing *et al.*, 2004), während *M. tuberculosis rpf* Tripel-Knockout Mutanten signifikant im Maus-Infektions-Modell attenuiert waren (Downing *et al.*, 2005). Ähnliches konnte für die Deletion von *icl1* und *icl2*, Isocitrate Lyase Gene, von *M. tuberculosis* gezeigt werden (McKinney *et al.*, 2000; Munoz-Elias & McKinney, 2005). Die Deletion von

*M. tuberculosis icl1* hatte nur einen geringen Einfluss auf die bakterielle Vermehrung in Maus-Makrophagen, zeigte eine leichte Reduktion der Bakterien in der Lunge von Mäusen in der chronischen Phase der Infektion und eine verminderte Gewebspathologie. Die Deletion von *icl2* hatte hingegen keinen erkennbaren Einfluss auf die Virulenz im Maus-Infektions-Modell. Im Gegensatz zu den *in vitro* und *in vivo* Ergebnissen der Einzel-Mutanten *icl1* und *icl2* stehen die der *icl1/icl2* Doppel-Mutante. Die *icl1/icl2* Doppel-Mutante zeigte eine starke Attenuation im Maus-Infektions-Modell. Innerhalb der ersten 2 Wochen nach Infektion konnte eine starke Abnahme der CFU in Lunge und Milz der infizierten Mäuse beobachtet werden (Munoz-Elias & McKinney, 2005). Die genannten Beispiele der Multiplen-Knockout Mutanten von *M. tuberculosis rpf* und *icl* verdeutlichen die Bedeutung der Generierung solcher multiplen Mutanten bei der Untersuchung zur Pathogenität von *M. tuberculosis*.

### 5.1.3 AtpD

AtpD ist als Bestandteil der  $F_0F_1$ -ATPase ein universell vorkommendes Protein. Diese ATPase nutzt einen elektrochemischen Gradienten zur Synthese von ATP, kann aber auch durch Hydrolyse von ATP einen elektrochemischen Gradienten aufbauen (Futai & Kanazawa, 1983; Futai *et al.*, 1989). Die Erkenntnisse über die  $F_0F_1$ -ATPase stammen überwiegend aus Untersuchungen in *E. coli*. Zusätzlich zur Funktion im Grundstoffwechsel hat die  $F_0F_1$ -ATPase in verschiedenen Bakterien weitere Funktionen. Bei Untersuchungen anderer Bakterienspezies stellte sich heraus, dass die  $F_0F_1$ -ATPase und somit auch das AtpD an der Regulierung des zytoplasmatischen pH-Wertes beteiligt ist. So konnte bei *Salmonella typhimurium* nach kurzer Inkubation im sauren Milieu (pH 6), ein Anstieg der Proteinsynthese von  $F_0F_1$ -ATPase Untereinheiten beobachtet werden. Die Säuretoleranz, die u.a. durch die  $F_0F_1$ -ATPase vermittelt wird, sichert das Überleben von *S. typhimurium* bis zu einem pH von 4,5 (Foster & Hall, 1990; Foster & Hall, 1991). Bei *Enterococcus faecalis* konnte nach Ansäuerung des Kulturmediums ebenfalls ein Anstieg der  $F_0F_1$ -ATPase-Synthese nachgewiesen werden (Kobayashi *et al.*, 1986; Shibata *et al.*, 1992). Die Regulation des intrazellulären pH-Werts, der im sauren Milieu durch Protonentransport aus der Zelle gewährleistet wird, ist für das Überleben unter diesen Bedingungen wichtig.

Obwohl *M. tuberculosis* intrazellulär in einem leicht angesäuerten Habitat (ein Phagosom mit den Charakteristika eines frühen Endosoms) lebt, gibt es nur wenige Arbeiten zur Säurestressregulation bei Mykobakterien. Rao und Kollegen untersuchten die intrazelluläre pH-Regulierung bei *M. smegmatis* und *M. bovis* BCG bei saurem pH. Wachstum bei pH-Werten von 4,5 und 5,0 lässt darauf schließen, dass auch Mykobakterien ihren zytoplasmatischen pH regulieren können (Iivanainen *et al.*, 1999; Rao *et al.*, 2001; Sturgill-Koszycki *et al.*, 1994). Eine Induktion der für die  $F_0F_1$ -ATPase kodierenden Gene konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Verschiedene Transkriptom- und Proteomanalysen von *M. tuberculosis* zeigen, dass eine Vielzahl von Genen unter verschiedenen *in vitro* Bedingungen wie z.B. Säurestress, Antibiotika und Nahrungsmangel verstärkt bzw. vermindert exprimiert werden. Eine Veränderung in der Transkription von *atpD* konnte jedoch nicht festgestellt werden (Boshoff *et al.*, 2004; Fisher *et al.*, 2002). Dies lässt vermuten, dass *atpD* konstitutiv exprimiert wird.

*atpD* kodiert die katalytische  $\beta$ -Untereinheit der  $F_0F_1$ -ATPase. Nach Infektion der humanen Makrophagenzelllinie THP-1 wurde mykobakterielles AtpD im Zytoplasma der Wirtszelle gefunden (Ragno *et al.*, 2001). Dieser Befund liess vermuten, dass AtpD nicht

nur eine Funktion bei der Generierung von ATP oder der Aufrechterhaltung des intrazellulären pH-Werts zukommt, sondern darüber hinaus in die Wirtszelle sekretiert wird. Als natürlicher Bestandteil der membrangebundenen  $F_0F_1$ -ATPase könnte *M. tuberculosis* AtpD mit der wirtseigenen vakuolären ATPase interagieren. Die vATPase ist essentiell für die Ansäuerung und weitere Reifung des Phagosoms. Im Vergleich zu anderen Phagosomen sind Phagosomen, die Mykobakterien enthalten, durch einen nur schwach sauren pH-Wert und einen verringerten Gehalt an vATPase charakterisiert (Sturgill-Koszycki *et al.*, 1994).

Um den Einfluss des *atpD*-Gens auf die Virulenz von *M. tuberculosis* zu untersuchen, wurde initial die Generierung eines *M. tuberculosis atpD* Knockout-Stammes versucht. Nach mehreren unabhängigen Gegenselektionen von 3'- und 5'*atpD single crossover* Stämmen, konnte jedoch kein *M. tuberculosis atpD*Δ Knockout-Stamm generiert werden. Kolonien mit einem Kan<sup>R</sup>/Sm<sup>R</sup> Phänotyp, welche auf ein zweites Rekombinationsereignis hindeuteten, wurden mit einer Frequenz von  $\sim 10^{-4}$  bis  $10^{-6}$  bei der Gegenselektion von *atpD* sco Stämmen beobachtet. Von jeder Gegenselektion wurden acht Klone genotypisch charakterisiert. Bei keinem der insgesamt 24 getesteten Klone konnte ein zweites *crossover* Ereignis nachgewiesen werden. Innerhalb dieser Klone waren weiterhin ein Wildtyp und ein inaktives Allel vorhanden. Dies lässt auf die Essentialität des Genes in *M. tuberculosis* schließen. In einer von Tran und Cook veröffentlichten Studie wurde die Essentialität des *atpD* Genes in *M. smegmatis* beschrieben (Tran & Cook, 2005). Die Autoren zeigten, dass *atpD* und somit die  $F_0F_1$ -ATP Synthase für das Wachstum von *M. smegmatis* essentiell ist. Desweiteren wurde von Sassetti und Kollegen *atpD* als essentielles Gen aufgrund einer saturierenden Himar1 Transposonmutagenese beschrieben (Sassetti *et al.*, 2003). Die in dieser Arbeit generierten Daten stützen die Vermutung einer Essentialität von *atpD* in *M. tuberculosis*. Der gesamte  $F_0F_1$ -ATP Synthasekomplex scheint eine physiologische Rolle bei Mykobakterien besonders unter sauren Bedingungen zu spielen und stellt somit potentielle Zielstrukturen von Antibiotika dar (Piddington *et al.*, 2000; Rao *et al.*, 2001). Die  $F_0F_1$ -ATP Synthase ist kürzlich als Angriffspunkt für ein Tuberkulostatikum, R207910, ein Diarylquinolin, identifiziert worden (Andries *et al.*, 2005). Innerhalb der  $F_0F_1$ -ATPase ist AtpE, welches für die C-Untereinheit im  $F_0$ -Segment kodiert, die Bindungsstelle für das Antibiotikum. Die antibakterielle Wirkung von R207910 ist vermutlich auf eine Energieverarmung des Bakteriums oder aber auf eine Störung der pH Homöostase zurückzuführen (Andries *et al.*, 2005).

Neben einer Generierung von Knockout-Stämmen ist die Überexpression von Virulenzgenen eine weitere Möglichkeit, den Einfluss spezifischer Proteine auf die

Pathogenese zu untersuchen (Fol *et al.*, 2006). Die Untersuchungen zur Expression und Sekretion von AtpD wurden mit verschiedenen genetischen Konstrukten durchgeführt, die eine Lokalisation der  $\beta$ -Untereinheit der  $F_0F_1$ -ATP Synthase von *M. tuberculosis* in der infizierten Zelle ermöglichen sollten. Zur Untersuchung der Expression des AtpD-Fusionsproteins, wurden Totalprotein-Extrakte der transformierten Mykobakterien gewonnen. Eine Expression des Fusionsproteins konnte in *M. tuberculosis* und *M. bovis* BCG nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den N-terminal markierten Konstrukten zeigten die Expressionskonstrukte, die ein C-terminal markiertes AtpD exprimieren, eine deutlich schwächere Expression. Möglicherweise wird der C-Terminus des Expressionproteins vom verwendeten Antikörper schlechter erkannt als jener des N-terminal markierten Expressionsproteins. Aufgrund einer unvollständigen Denaturierung des Proteins, könnte die HA-Erkennungssequenz für den Antikörper unzugänglich sein und damit ist die Expression nur schwer nachweisbar. Unter *in vitro* Kulturbedingungen war keine Sezernierung von AtpD zu beobachten, weder N- noch C-terminal markiertes AtpD konnte im Kulturüberstand von *M. bovis* BCG nachgewiesen werden. In *M. tuberculosis* wurde kürzlich ein neuartiges Proteinsekretionssystem identifiziert, welches für die Sekretion von Esat-6/CFP-10 verantwortlich ist. Esat-6/CFP-10 sind in der RD1-Region (*region of difference*) kodiert. Neben den sekretierten Proteinen Esat-6/CFP-10 werden auch die Proteine des Sekretionsapparates Snm in der RD1-Region kodiert (Stanley *et al.*, 2003). Bei der Entstehung von *M. bovis* BCG aus virulenten *M. bovis* wurde die RD1-Region deletiert und hat wahrscheinlich zur Attenuation des Erregers beigetragen (Mahairas *et al.*, 1996). *M. bovis* BCG ist also nicht in der Lage, Proteine mittels dieses Sekretionssystems zu translozieren. Da der Sekretionsmechanismus von AtpD nicht bekannt ist, war nicht anzuschliessen, dass *M. bovis* BCG nicht über das notwendige Sekretionssystem verfügt, um AtpD zu sekretieren. AtpD besitzt wie Esat-6/CFP-10 keine Sekretionssequenz, welche von einem Sekretionssystemen erkannt werden kann. Dies ist ein Hinweis auf eine mögliche Sekretion von AtpD durch ein alternatives Sekretionssystem. Ursache für die nicht nachgewiesene AtpD-Sekretion in den Kulturüberstand von *M. bovis* BCG könnte die mangelnde Expression eines funktionierenden Sekretionsapparates sein. Da trotz der Fällung des Filtrats unter den Kulturbedingungen eine Sezernierung des markierten AtpD in den Kulturüberstand von *M. tuberculosis* nicht nachweisbar war, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die von Ragno und Kollegen erhobenen Daten ein Artefakt darstellen, welche auf eine Expression von AtpD und/oder eine besondere Stabilität dieses Proteins zurückzuführen ist (Ragno *et al.*, 2001). Es wurden keine weiteren Anhaltspunkte für eine Sezernierung des mykobakteriellen AtpD gefunden.

#### 5.1.4 HbhA

In den vergangenen Jahren zeigten Untersuchungen von Zellwandkomponenten aus Mykobakterien, insbesondere aus *M. tuberculosis*, dass viele dieser Komponenten (z.B. Lipoarabinomannan und verschiedene Proteine) eine wichtige Rolle in der Virulenz spielen. Die mykobakterielle Zellwand bietet Schutz vor toxischen Molekülen (ROI – *reactive oxygen intermediates*; RNI – *reactive nitrogen intermediates*), welche von Makrophagen gebildet werden und verhindert die Reifung des Phagosoms zum Phagolysosom (Bogdan *et al.*, 2000; Daffe & Draper, 1998; Raja, 2004). Die Zellwand wird generell als wichtiger mykobakterieller Virulenzfaktor angesehen und ist auch bei der Adhäsion der Bakterien an Makrophagen von Bedeutung. Für intrazelluläre Pathogene ist die Adhäsion an die eukaryotische Zelle eine wichtige Voraussetzung für eine Infektion. Adhäsionsfaktoren, Adhäsine genannt, die dem spezifischen Anhaften an Wirtszellen über Adhäsion-Rezeptor-Interaktionen dienen, stellen somit wichtige bakterielle Virulenzfaktoren dar. Es ist jedoch kaum bekannt, welche Komponenten tatsächlich an einer vermittelnden Bindung zwischen Mykobakterium und Makrophage beteiligt sind (Smith, 2003; Stokes *et al.*, 2004).

Eine wichtige Funktion der Makrophagen ist die Phagozytose von Mikroorganismen, für deren Bindung eine große Anzahl verschiedener Rezeptoren zur Verfügung stehen. Über die Aufnahmemechanismen von Mykobakterien durch Makrophagen ist jedoch noch wenig bekannt (Bermudez & Sangari, 2001; El-Etr & Cirillo, 2001; Villeneuve *et al.*, 2005). Der Komplementrezeptor 3 (CR3) scheint eine besondere Bedeutung bei der Phagozytose von Mykobakterien zu haben (Rooyakkers & Stokes, 2005; Velasco-Velazquez *et al.*, 2003). Über Liganden des Bakteriums ist nur sehr wenig bekannt.

HbhA ist ein Glykoprotein, welches als ein Adhäsion bei pathogenen Mykobakterien, jedoch nicht bei apathogenen Mykobakterien, beschrieben wurde. Es dient als ein wichtiges Adhäsion bei der Bindung an Epithelzellen und der extrazellulären Matrix (Menozzi *et al.*, 1998; Menozzi *et al.*, 1996). Eine von Pethe und Kollegen generierte *M. tuberculosis hbhA* Knockout Mutante zeigt eine Attenuation im Maus-Infektions-Modell, welche auf eine fehlende Kolonisierung der Milz nach intranasaler Infektion zurückzuführen ist. Aus dieser Beobachtung wurde der Schluss gezogen, dass HbhA entscheidend für die extrapulmonale Streuung (Dissemination) ist, jedoch nicht für die Phagozytose durch professionellen Phagozyten (Mueller-Ortiz *et al.*, 2002; Pethe *et al.*, 2001a). In einer Untersuchung von Leemans und Kollegen (Leemans *et al.*, 2003) wurde die Rolle von CD44 als Bindungsstelle bei der Aufnahme von *M. tuberculosis* durch

Makrophagen untersucht. Dabei identifizierten sie CD44 als eine Bindestelle für *M. tuberculosis*, welche die mykobakterielle Phagozytose durch Makrophagen vermittelt. Diese Beobachtung machte eine erneute Untersuchung der Bedeutung von *M. tuberculosis* HbhA bei der Interaktion mit professionellen Phagozyten notwendig.

#### **5.1.4.1 *M. tuberculosis* HbhA ist an der Interaktion mit primären Makrophagen beteiligt**

Um eine Beteiligung des Proteins bei der Interaktion von pathogenen Mykobakterien mit verschiedenen primären Zellen zu untersuchen, wurde der *M. tuberculosis* *hbhA* Knockout Stamm *hbhAΔ* generiert. Dieser Stamm wurde in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Infektions-Modellen untersucht. Bei den *in vivo* Untersuchungen im Maus-Infektions-Modell konnte eine Attenuation des *hbhAΔ* Stammes festgestellt werden. Sowohl die verringerte Anzahl von CFU des *hbhAΔ* Stammes in verschiedenen Organen, als auch die längere Überlebenszeit *hbhAΔ* infizierter Mäuse zeigen, dass die *hbhAΔ* Mutante einen Virulenzphänotyp aufweist. Der *hbhAΔ* Stamm zeigte sowohl beim *in vitro* Wachstum im Flüssigkulturmedium 7H9 als auch auf dem Festmedium 7H10 keinerlei Unterschiede zum Parentalstamm *M. tuberculosis* H37Rv. Die weiteren Virulenzuntersuchungen von *hbhAΔ* im Zellkultur-Infektions-Modell mit BMDM zeigten, dass HbhA keinen Einfluss auf die intrazelluläre Vermehrung von *M. tuberculosis* hat. Dies lässt vermuten, dass die beobachtete *in vivo* Attenuation des *hbhAΔ* Knockout Stammes weder auf eine verminderte Fitness noch auf eine verringerte intrazelluläre Vermehrung zurückzuführen ist. Kürzlich veröffentlichte Studien weisen darauf hin, dass neutrophile Granulozyten bei der Pathogenese mykobakterieller Infektionen eine wichtige Rolle spielen, und dass neutrophile Granulozyten in der Lage sind, als Vektoren für lebende Mykobakterien zu dienen (Abadie *et al.*, 2005; Eruslanov *et al.*, 2005).

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete *in vivo* Attenuation der *hbhAΔ* Mutante ist vergleichbar mit vorhergehenden Veröffentlichungen (Mueller-Ortiz *et al.*, 2002; Pethe *et al.*, 2001a). Die verlängerte Überlebenszeit der mit *hbhAΔ* Knockout Stamm infizierten Mäuse geben die verringerte bakterielle Anzahl der Bakterien in der Lunge dieser Mäuse wieder. Basierend auf den Beobachtungen, dass die Inaktivierung von *hbhA* die Adhäsion an und Invasion in Epithelzellen, jedoch nicht an Maus- oder Humanmakrophagen, vermindert ist, vermuteten Pethe und Kollegen, dass die reduzierte extrapulmonale Dissemination dieser Mutante im intranasalen Maus-Infektions-Modell auf eine direkte Interaktion mit nicht-phagozytischen Zellen zurückzuführen ist (Pethe *et al.*, 2001a). Pethe und Kollegen zeigten, dass kein Phagozytoseunterschied zwischen einer *hbhAΔ* Mutante und den Parentalstamm in Makrophagen besteht, jedoch eine Reduktion der Phagozytose bei Lungenepithelzellen (Pethe *et al.*, 2001a). Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten



Daten, zeigen einen signifikanten Phagozytosedefekt der *hbhAΔ* Mutante im Vergleich zum Parentalstamm H37Rv. Pethe *et al.* verwendeten in ihren Studien die Zellkulturlinie J774 während in der vorliegenden Arbeit die Untersuchungen zur Phagozytose mit primären Zellen durchgeführt wurden. Aus verschiedenen Studien ist bekannt, dass immortalisierte Zelllinien mit ihren Charakteristika nicht repräsentativ für primäre Zelltypen, von denen sie abgeleitet wurden, sein müssen (Stahl & Gordon, 1982; Yan & Cirillo, 2004). So wird beispielsweise der Mannoserezeptor, welcher bei der Adhäsion von *M. tuberculosis* an phagozytische Zellen beteiligt ist, auf primären Makrophagen jedoch nicht auf J774 oder anderen immortalisierten Zelllinien exprimiert (Stahl & Gordon, 1982). Möglicherweise ist die differenzielle Expression dieses Rezeptors eine Erklärung für die beobachteten Unterschiede. Die angewendeten *in vivo* und *ex vivo* Infektionsversuche mit verschiedenen eukaryotischen Zelltypen (peritoneale neutrophile Granulozyten, peritoneale Makrophagen, Lungenmakrophagen, Knochenmarkzellen) mit *M. tuberculosis* H37Rv und *hbhAΔ* ergaben, dass sowohl die Phagozytoserate als auch die phagozytische Anzahl des *hbhAΔ* Stammes im Vergleich zum Parentalstamm vermindert sind. Der Phagozytosedefekt konnte in allen untersuchten professionellen Phagozyten beobachtet werden, sowohl in *in vivo* als auch in *ex vivo* Infektionsversuchen. Somit kann HbhA als ein wichtiger Ligand für professionelle Phagozyten angesehen werden. Eine Überprüfung der Spezifität der HbhA vermittelten Phagozytose bei verschiedenen primären Zellen erfolgte mittels eines Kompetitors. Eine Blockierung der HbhA-Rezeptor-Interaktion wurde durch Zugabe von exogenem Heparin zu den primären Zellen erreicht. Die Zugabe von Heparin zu *M. tuberculosis* H37Rv hat eine verminderte Phagozytose durch BMDM zur Folge, während diejenige des *hbhAΔ* Stammes unverändert blieb. Dieses Resultat macht deutlich, dass HbhA ein Ligand für einen spezifischen Rezeptor ist und eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion und Phagozytose spielt. HbhA kann jedoch nicht das einzige Adhäsion darstellen, da die Phagozytose des Wildtyps in Gegenwart von Heparin noch ca. 65% beträgt. Kürzlich konnte von Sechi und Kollegen gezeigt werden, dass auch das Pathogen *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) ein HbhA aufweist, welches dem von *M. tuberculosis* homolog ist (Sechi *et al.*, 2006). Das HbhA Protein von MAP wird an der Zelloberfläche exprimiert und vom Immunsystem des Wirts erkannt. Es ist an einer Adhäsion des Bakteriums beteiligt. Ein weiteres Adhäsion könnte die Malatsynthase von *M. tuberculosis* sein. Dieses Enzym weist lamininbindende Eigenschaften auf (Kinhikar *et al.*, 2006). Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass HbhA ein wichtiges Adhäsion für die Interaktion mit allen professionellen Phagozyten des Wirtes ist und dass die verspätete Streuung in die sekundären Organe auf eine verringerte Vermehrung in den primär infizierten Organen zurückzuführen ist (Mischenko *et al.*, 2006).

## 6 Literatur

- Abadie, V., Badell, E., Douillard, P., Ensergueix, D., Leenen, P. J., Tanguy, M., Fiette, L., Saeland, S., Gicquel, B. & Winter, N. (2005).** Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after *Mycobacterium bovis* BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes. *Blood* **106**, 1843-1850.
- Abrahams, J. P., Leslie, A. G., Lutter, R. & Walker, J. E. (1994).** Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**, 621-628.
- Abrami, L., Reig, N. & van der Goot, F. G. (2005).** Anthrax toxin: the long and winding road that leads to the kill. *Trends Microbiol* **13**, 72-78.
- Ahuja, N., Kumar, P. & Bhatnagar, R. (2004).** The adenylate cyclase toxins. *Crit Rev Microbiol* **30**, 187-196.
- Alonso, S., Reveneau, N., Pethe, K. & Locht, C. (2002).** Eighty-kilodalton N-terminal moiety of *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin: adherence, immunogenicity, and protective role. *Infect Immun* **70**, 4142-4147.
- Amer, A. O. & Swanson, M. S. (2002).** A phagosome of one's own: a microbial guide to life in the macrophage. *Curr Opin Microbiol* **5**, 56-61.
- Andries, K., Verhasselt, P., Guillemont, J., Gohlmann, H. W., Neefs, J. M., Winkler, H., Van Gestel, J., Timmerman, P., Zhu, M., Lee, E., Williams, P., de Chaffoy, D., Huitric, E., Hoffner, S., Cambau, E., Truffot-Pernot, C., Lounis, N. & Jarlier, V. (2005).** A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **307**, 223-227.
- Ausubel, F. M., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K. (2006).** *Current Protocols in Molecular biology*: John Wiley & Sons, Inc.
- Bai, G., McCue, L. A. & McDonough, K. A. (2005).** Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Rv3676 (CRPMt), a Cyclic AMP Receptor Protein-Like DNA Binding Protein. *J Bacteriol* **187**, 7795-7804.
- Baker, D. A. & Kelly, J. M. (2004).** Structure, function and evolution of microbial adenylyl and guanylyl cyclases. *Mol Microbiol* **52**, 1229-1242.
- Barzu, O. & Danchin, A. (1994).** Adenylyl cyclases: a heterogeneous class of ATP-utilizing enzymes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **49**, 241-283.
- Behr, M. A., Wilson, M. A., Gill, W. P., Salamon, H., Schoolnik, G. K., Rane, S. & Small, P. M. (1999).** Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* **284**, 1520-1523.
- Bendtsen, J. D., Kiemer, L., Fausboll, A. & Brunak, S. (2005).** Non-classical protein secretion in bacteria. *BMC Microbiol* **5**, 58.
- Bermudez, L. E. & Goodman, J. (1996).** *Mycobacterium tuberculosis* invades and replicates within type II alveolar cells. *Infect Immun* **64**, 1400-1406.
- Bermudez, L. E. & Sangari, F. J. (2001).** Cellular and molecular mechanisms of internalization of mycobacteria by host cells. *Microbes Infect* **3**, 37-42.
- Berthet, F. X., Rasmussen, P. B., Rosenkrands, I., Andersen, P. & Gicquel, B. (1998).** A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiology* **144** ( Pt 11), 3195-3203.

- Bogdan, C., Rollinghoff, M. & Diefenbach, A. (2000).** Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* **12**, 64-76.
- Boshoff, H. I., Myers, T. G., Copp, B. R., McNeil, M. R., Wilson, M. A. & Barry, C. E., 3rd (2004).** The transcriptional responses of *Mycobacterium tuberculosis* to inhibitors of metabolism: novel insights into drug mechanisms of action. *J Biol Chem* **279**, 40174-40184.
- Botsford, J. L. & Harman, J. G. (1992).** Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiol Rev* **56**, 100-122.
- Braunstein, M., Espinosa, B. J., Chan, J., Belisle, J. T. & Jacobs, W. R., Jr. (2003).** SecA2 functions in the secretion of superoxide dismutase A and in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **48**, 453-464.
- Brennan, P. J. (2003).** Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* **83**, 91-97.
- Brodin, P., Rosenkrands, I., Andersen, P., Cole, S. T. & Brosch, R. (2004).** ESAT-6 proteins: protective antigens and virulence factors? *Trends Microbiol* **12**, 500-508.
- Brodin, P., Majlessi, L., Marsollier, L., de Jonge, M. I., Bottai, D., Demangel, C., Hinds, J., Neyrolles, O., Butcher, P. D., Leclerc, C., Cole, S. T. & Brosch, R. (2006).** Dissection of ESAT-6 system 1 of *Mycobacterium tuberculosis* and impact on immunogenicity and virulence. *Infect Immun* **74**, 88-98.
- Brosch, R., Gordon, S. V., Billault, A., Garnier, T., Eiglmeier, K., Soravito, C., Barrell, B. G. & Cole, S. T. (1998).** Use of a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv bacterial artificial chromosome library for genome mapping, sequencing, and comparative genomics. *Infect Immun* **66**, 2221-2229.
- Brosch, R., Gordon, S. V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutierrez, C., Hewinson, G., Kremer, K., Parsons, L. M., Pym, A. S., Samper, S., van Soolingen, D. & Cole, S. T. (2002).** A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3684-3689.
- Calmette, A. & Guérin, C. (1920).** *Ann. Inst. Pasteur* **34**.
- Camacho, L. R., Constant, P., Raynaud, C., Laneelle, M. A., Triccas, J. A., Gicquel, B., Daffe, M. & Guilhot, C. (2001).** Analysis of the phthiocerol dimycocerosate locus of *Mycobacterium tuberculosis*. Evidence that this lipid is involved in the cell wall permeability barrier. *J Biol Chem* **276**, 19845-19854.
- Camus, J. C., Pryor, M. J., Medigue, C. & Cole, S. T. (2002).** Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology* **148**, 2967-2973.
- Cardona, P. J., Cooper, A., Luquin, M., Ariza, A., Filipo, F., Orme, I. M. & Ausina, V. (1999).** The intravenous model of murine tuberculosis is less pathogenic than the aerogenic model owing to a more rapid induction of systemic immunity. *Scand J Immunol* **49**, 362-366.
- Casadevall, A. & Pirofski, L. A. (1999).** Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect Immun* **67**, 3703-3713.
- Casadevall, A. & Pirofski, L. (2001).** Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *J Infect Dis* **184**, 337-344.
- Castro, L. I., Hermesen, C., Schultz, J. E. & Linder, J. U. (2005).** Adenylyl cyclase Rv0386 from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv uses a novel mode for substrate selection. *Febs J* **272**, 3085-3092.
- Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C. E., 3rd, Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N.,**

- Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M. A., Rajandream, M. A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J. E., Taylor, K., Whitehead, S. & Barrell, B. G. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**, 537-544.
- Corbett, E. L., Watt, C. J., Walker, N., Maher, D., Williams, B. G., Raviglione, M. C. & Dye, C. (2003). The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch Intern Med* **163**, 1009-1021.
- Cosma, C. L., Sherman, D. R. & Ramakrishnan, L. (2003). The secret lives of the pathogenic mycobacteria. *Annu Rev Microbiol* **57**, 641-676.
- Cotta, M. A., Whitehead, T. R. & Wheeler, M. B. (1998). Identification of a novel adenylate cyclase in the ruminal anaerobe, *Prevotella ruminicola* D31d. *FEMS Microbiol Lett* **164**, 257-260.
- Daffe, M. & Draper, P. (1998). The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv Microb Physiol* **39**, 131-203.
- Derouaux, A., Halici, S., Nothaft, H., Neutelings, T., Moutzourelis, G., Dusart, J., Titgemeyer, F. & Rigali, S. (2004). Deletion of a cyclic AMP receptor protein homologue diminishes germination and affects morphological development of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **186**, 1893-1897.
- Desjardin, L. E. (1995). Biogenesis of phagolysosomes: the "kiss and run" hypothesis. *Trends Cell Biol* **5**.
- Desjardin, L. E. & Schlesinger, L. S. (2000). Identifying *Mycobacterium tuberculosis* virulence determinants - new technologies for a difficult problem. *Trends Microbiol* **8**, 97-100;.
- Dittrich, D., Keller, C., Ehlers, S., Schultz, J. E. & Sander, P. (2006). Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* mutant deficient in pH-sensing adenylate cyclase Rv1264. *Int J Med Microbiol* **296**, 563-566.
- Downing, K. J., Betts, J. C., Young, D. I., McAdam, R. A., Kelly, F., Young, M. & Mizrahi, V. (2004). Global expression profiling of strains harbouring null mutations reveals that the five *rpf*-like genes of *Mycobacterium tuberculosis* show functional redundancy. *Tuberculosis (Edinb)* **84**, 167-179.
- Downing, K. J., Mischenko, V. V., Shleeva, M. O., Young, D. I., Young, M., Kaprelyants, A. S., Apt, A. S. & Mizrahi, V. (2005). Mutants of *Mycobacterium tuberculosis* lacking three of the five *rpf*-like genes are defective for growth in vivo and for resuscitation in vitro. *Infect Immun* **73**, 3038-3043.
- Duclos, S. & Desjardins, M. (2000). Subversion of a young phagosome: the survival strategies of intracellular pathogens. *Cell Microbiol* **2**, 365-377.
- El-Etr, S. H. & Cirillo, J. D. (2001). Entry mechanisms of mycobacteria. *Front Biosci* **6**, D737-747.
- Ernst, J. D. (1998). Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **66**, 1277-1281.
- Eruslanov, E. B., Lyadova, I. V., Kondratieva, T. K., Majorov, K. B., Scheglov, I. V., Orlova, M. O. & Apt, A. S. (2005). Neutrophil responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection in genetically susceptible and resistant mice. *Infect Immun* **73**, 1744-1753.
- Fenton, M. J., Riley, L. W. & Schlesinger, L. S. (2005). Receptor-Mediated Recognition of *Mycobacterium tuberculosis* by Host Cells. In *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*, pp. 405-426. Edited by S. T. Cole, K. D. Eisenach, D. N. McMurray & W. R. Jacobs, Jr.

- Fine, P. E. (1995).** Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet* **346**, 1339-1345.
- Finlay, B. B. & Falkow, S. (1997).** Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 136-169.
- Fisher, M. A., Plikaytis, B. B. & Shinnick, T. M. (2002).** Microarray analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* transcriptional response to the acidic conditions found in phagosomes. *J Bacteriol* **184**, 4025-4032.
- Flynn, J. L. (2006).** Lessons from experimental *Mycobacterium tuberculosis* infections. *Microbes Infect* **8**, 1179-1188.
- Flynn, J. L. & Chan, J. (2001).** Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* **19**, 93-129.
- Fol, M., Chauhan, A., Nair, N. K., Maloney, E., Moomey, M., Jagannath, C., Madiraju, M. V. & Rajagopalan, M. (2006).** Modulation of *Mycobacterium tuberculosis* proliferation by MtrA, an essential two-component response regulator. *Mol Microbiol* **60**, 643-657.
- Foster, J. W. & Hall, H. K. (1990).** Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **172**, 771-778.
- Foster, J. W. & Hall, H. K. (1991).** Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **173**, 5129-5135.
- Frieden, T. R., Sterling, T. R., Munsiff, S. S., Watt, C. J. & Dye, C. (2003).** Tuberculosis. *Lancet* **362**, 887-899.
- Futai, M. & Kanazawa, H. (1983).** Structure and function of proton-translocating adenosine triphosphatase (F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>): biochemical and molecular biological approaches. *Microbiol Rev* **47**, 285-312.
- Futai, M., Noumi, T. & Maeda, M. (1989).** ATP synthase (H<sup>+</sup>-ATPase): results by combined biochemical and molecular biological approaches. *Annu Rev Biochem* **58**, 111-136.
- Galperin, M. Y. (2004).** Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environ Microbiol* **6**, 552-567.
- Gandhi, N. R., Moll, A., Sturm, A. W., Pawinski, R., Govender, T., Laloo, U., Zeller, K., Andrews, J. & Friedland, G. (2006).** Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. *Lancet* **368**, 1575-1580.
- Garbe, T. R., Barathi, J., Barnini, S., Zhang, Y., Abou-Zeid, C., Tang, D., Mukherjee, R. & Young, D. B. (1994).** Transformation of mycobacterial species using hygromycin resistance as selectable marker. *Microbiology* **140** ( Pt 1), 133-138.
- Gazdik, M. A. & McDonough, K. A. (2005).** Identification of cyclic AMP-regulated genes in *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria under low-oxygen conditions. *J Bacteriol* **187**, 2681-2692.
- Glickman, M. S. & Jacobs, W. R., Jr. (2001).** Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline. *Cell* **104**, 477-485.
- Golden, M. P. & Vikram, H. R. (2005).** Extrapulmonary tuberculosis: an overview. *Am Fam Physician* **72**, 1761-1768.
- Gomez, M., Doukhan, L., Nair, G. & Smith, I. (1998).** *sigA* is an essential gene in *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* **29**, 617-628.

- Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Garnier, T., Brosch, R., Parkhill, J., Barrell, B., Cole, S. T. & Hewinson, R. G. (2001).** Genomics of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis (Edinb)* **81**, 157-163.
- Grandmann, C. (2005).** *Krankheit im Labor. Robert Koch und die medizinische Mikrobiologie*. Wallenstein-Verlag, Göttingen.
- Guo, Q., Shen, Y., Lee, Y. S., Gibbs, C. S., Mrksich, M. & Tang, W. J. (2005a).** Structural basis for the interaction of *Bordetella pertussis* adenyl cyclase toxin with calmodulin. *Embo J* **24**, 3190-3201.
- Guo, Y. L., Seebacher, T., Kurz, U., Linder, J. U. & Schultz, J. E. (2001).** Adenyl cyclase Rv1625c of *Mycobacterium tuberculosis*: a progenitor of mammalian adenyl cyclases. *Embo J* **20**, 3667-3675.
- Guo, Y. L., Kurz, U., Schultz, A., Linder, J. U., Dittrich, D., Keller, C., Ehlers, S., Sander, P. & Schultz, J. E. (2005b).** Interaction of Rv1625c, a mycobacterial class IIIa adenyl cyclase, with a mammalian congener. *Mol Microbiol* **57**, 667-677.
- Gupta, U. D. & Katoch, V. M. (2005).** Animal models of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* **85**, 277-293.
- Heise, T. & Dersch, P. (2006).** Identification of a domain in Yersinia virulence factor YadA that is crucial for extracellular matrix-specific cell adhesion and uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C. & Ala'Aldeen, D. (2004).** Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 692-744.
- Hernandez Pando, R., Aguilar, L. D., Infante, E., Cataldi, A., Bigi, F., Martin, C. & Gicquel, B. (2006).** The use of mutant mycobacteria as new vaccines to prevent tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*.
- Hestvik, A. L., Hmama, Z. & Av-Gay, Y. (2005).** Mycobacterial manipulation of the host cell. *FEMS Microbiol Rev* **29**, 1041-1050.
- Hingley-Wilson, S. M., Sambandamurthy, V. K. & Jacobs, W. R., Jr. (2003).** Survival perspectives from the world's most successful pathogen, *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Immunol* **4**, 949-955.
- Hurley, J. H. (1998).** The adenyl cyclase and guanylyl cyclase superfamily. *Curr Opin Struct Biol* **8**, 770-777.
- Iivanainen, E., Martikainen, P. J., Vaananen, P. & Katila, M. L. (1999).** Environmental factors affecting the occurrence of mycobacteria in brook sediments. *J Appl Microbiol* **86**, 673-681.
- Katoch, V. M. (2004).** Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). *Indian J Med Res* **120**, 290-304.
- Kendall, S. L., Rison, S. C., Movahedzadeh, F., Frita, R. & Stoker, N. G. (2004).** What do microarrays really tell us about *M. tuberculosis*? *Trends Microbiol* **12**, 537-544.
- Kim, D. K., Park, G. M., Hwang, Y. I., Kim, H. J., Han, S. K., Shim, Y. S. & Yim, J. J. (2006).** Microarray analysis of gene expression associated with extrapulmonary dissemination of tuberculosis. *Respirology* **11**, 557-565.
- Kim, Y. R., Kim, S. Y., Kim, C. M., Lee, S. E. & Rhee, J. H. (2005).** Essential role of an adenylate cyclase in regulating *Vibrio vulnificus* virulence. *FEMS Microbiol Lett* **243**, 497-503.
- Kimura, Y., Ohtani, M. & Takegawa, K. (2005).** An adenyl cyclase, CyaB, acts as an osmosensor in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **187**, 3593-3598.

- Kimura, Y., Mishima, Y., Nakano, H. & Takegawa, K. (2002).** An adenyl cyclase, CyaA, of *Myxococcus xanthus* functions in signal transduction during osmotic stress. *J Bacteriol* **184**, 3578-3585.
- Kinhikar, A. G., Vargas, D., Li, H., Mahaffey, S. B., Hinds, L., Belisle, J. T. & Laal, S. (2006).** *Mycobacterium tuberculosis* malate synthase is a laminin-binding adhesin. *Mol Microbiol* **60**, 999-1013.
- Kobayashi, H., Suzuki, T. & Unemoto, T. (1986).** Streptococcal cytoplasmic pH is regulated by changes in amount and activity of a proton-translocating ATPase. *J Biol Chem* **261**, 627-630.
- Lawson, C. L., Swigon, D., Murakami, K. S., Darst, S. A., Berman, H. M. & Ebright, R. H. (2004).** Catabolite activator protein: DNA binding and transcription activation. *Curr Opin Struct Biol* **14**, 10-20.
- Leemans, J. C., Florquin, S., Heikens, M., Pals, S. T., van der Neut, R. & Van Der Poll, T. (2003).** CD44 is a macrophage binding site for *Mycobacterium tuberculosis* that mediates macrophage recruitment and protective immunity against tuberculosis. *J Clin Invest* **111**, 681-689.
- Linder, J. U. (2006).** Class III adenyl cyclases: molecular mechanisms of catalysis and regulation. *Cell Mol Life Sci* **63**, 1736-1751.
- Linder, J. U. & Schultz, J. E. (2003).** The class III adenyl cyclases: multi-purpose signalling modules. *Cell Signal* **15**, 1081-1089.
- Linder, J. U., Schultz, A. & Schultz, J. E. (2002).** Adenyl cyclase Rv1264 from *Mycobacterium tuberculosis* has an autoinhibitory N-terminal domain. *J Biol Chem* **277**, 15271-15276.
- Linder, J. U., Hammer, A. & Schultz, J. E. (2004).** The effect of HAMP domains on class IIIb adenyl cyclases from *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Biochem* **271**, 2446-2451.
- Locht, C., Hougardy, J. M., Rouanet, C., Place, S. & Mascart, F. (2006).** Heparin-binding hemagglutinin, from an extrapulmonary dissemination factor to a powerful diagnostic and protective antigen against tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* **86**, 303-309.
- Lory, S., Wolfgang, M., Lee, V. & Smith, R. (2004).** The multi-talented bacterial adenylate cyclases. *Int J Med Microbiol* **293**, 479-482.
- Lowrie, D. B., Jackett, P. S. & Ratcliffe, N. A. (1975).** *Mycobacterium microti* may protect itself from intracellular destruction by releasing cyclic AMP into phagosomes. *Nature* **254**, 600-602.
- Lowrie, D. B., Aber, V. R. & Jackett, P. S. (1979).** Phagosome-lysosome fusion and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate in macrophages infected with *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium bovis* BCG or *Mycobacterium lepraemurium*. *J Gen Microbiol* **110**, 431-441.
- Lyadova, I. V., Eruslanov, E. B., Khaidukov, S. V., Yeremeev, V. V., Majorov, K. B., Pichugin, A. V., Nikonenko, B. V., Kondratieva, T. K. & Apt, A. S. (2000).** Comparative analysis of T lymphocytes recovered from the lungs of mice genetically susceptible, resistant, and hyperresistant to *Mycobacterium tuberculosis*-triggered disease. *J Immunol* **165**, 5921-5931.
- Lydiate, D. J., Ashby, A. M. & Henderson, D. J., Kieser, H.M. and Hopwood, D.A. (1989).** Physical and genetic characterisation of linear copies of the *Streptomyces coelicolor* mini-circle. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 941-955.
- Mahairas, G. G., Sabo, P. J., Hickey, M. J., Singh, D. C. & Stover, C. K. (1996).** Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol* **178**, 1274-1282.
- Majorov, K. B., Lyadova, I. V., Kondratieva, T. K., Eruslanov, E. B., Rubakova, E. I., Orlova, M. O., Mischenko, V. V. & Apt, A. S. (2003).** Different innate ability of I/St and A/Sn mice to combat

virulent *Mycobacterium tuberculosis*: phenotypes expressed in lung and extrapulmonary macrophages. *Infect Immun* **71**, 697-707.

**McCue, L. A., McDonough, K. A. & Lawrence, C. E. (2000).** Functional classification of cNMP-binding proteins and nucleotide cyclases with implications for novel regulatory pathways in *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res* **10**, 204-219.

**McDonough, K. A. & Kress, Y. (1995).** Cytotoxicity for lung epithelial cells is a virulence-associated phenotype of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **63**, 4802-4811.

**McKinney, J. D., Honer zu Bentrup, K., Munoz-Elias, E. J., Miczak, A., Chen, B., Chan, W. T., Swenson, D., Sacchettini, J. C., Jacobs, W. R., Jr. & Russell, D. G. (2000).** Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* **406**, 735-738.

**Menozzi, F. D., Bischoff, R., Fort, E., Brennan, M. J. & Locht, C. (1998).** Molecular characterization of the mycobacterial heparin-binding hemagglutinin, a mycobacterial adhesin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 12625-12630.

**Menozzi, F. D., Rouse, J. H., Alavi, M., Laude-Sharp, M., Muller, J., Bischoff, R., Brennan, M. J. & Locht, C. (1996).** Identification of a heparin-binding hemagglutinin present in mycobacteria. *J Exp Med* **184**, 993-1001.

**Mischenko, V. V., Dittrich, D.\*, Rampini, S. K.\*, Majorov, K. B., Scheglov, I. V., Böttger, E. C., Apt, A. S. & Sander, P. (2006).** Identification of *Mycobacterium tuberculosis* HBHA as a principal adhesin for professional phagocytes. *Eingereicht zur Veröffentlichung,\*gleichberechtigte Erstautoren.*

**Motaal, A. A., Tews, I., Schultz, J. E. & Linder, J. U. (2006).** Fatty acid regulation of adenylyl cyclase Rv2212 from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Febs J* **273**, 4219-4228.

**Mueller-Ortiz, S. L., Sepulveda, E., Olsen, M. R., Jagannath, C., Wanger, A. R. & Norris, S. J. (2002).** Decreased infectivity despite unaltered C3 binding by a DeltahbHA mutant of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **70**, 6751-6760.

**Munoz-Elias, E. J. & McKinney, J. D. (2005).** *Mycobacterium tuberculosis* isocitrate lyases 1 and 2 are jointly required for in vivo growth and virulence. *Nat Med* **11**, 638-644.

**Mustafa Abu, S. & Al-Attiyah, R. (2003).** Tuberculosis: looking beyond BCG vaccines. *J Postgrad Med* **49**, 134-140.

**North, R. J., LaCourse, R. & Ryan, L. (1999).** Vaccinated mice remain more susceptible to *Mycobacterium tuberculosis* infection initiated via the respiratory route than via the intravenous route. *Infect Immun* **67**, 2010-2012.

**Padh, H. & Venkitasubramanian, T. A. (1976a).** Adenosine 3', 5'-monophosphate in mycobacteria. *Life Sci* **20**, 1273-1280.

**Padh, H. & Venkitasubramanian, T. A. (1976b).** Adenosine 3',5'-monophosphate in *Mycobacterium phlei* and *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *Microbios* **16**, 183-189.

**Pallen, M. J., Chaudhuri, R. R. & Henderson, I. R. (2003).** Genomic analysis of secretion systems. *Curr Opin Microbiol* **6**, 519-527.

**Pavelka, M. S., Jr. & Jacobs, W. R., Jr. (1999).** Comparison of the construction of unmarked deletion mutations in *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin, and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv by allelic exchange. *J Bacteriol* **181**, 4780-4789.

**Pena, C. E., Lee, M. H., Pedulla, M. L. & Hatfull, G. F. (1997).** Characterization of the mycobacteriophage L5 attachment site, attP. *J Mol Biol* **266**, 76-92.



- Petersen, S. & Young, G. M. (2002).** Essential role for cyclic AMP and its receptor protein in *Yersinia enterocolitica* virulence. *Infect Immun* **70**, 3665-3672.
- Pethe, K., Aumercier, M., Fort, E., Gatot, C., Loch, C. & Menozzi, F. D. (2000).** Characterization of the heparin-binding site of the mycobacterial heparin-binding hemagglutinin adhesin. *J Biol Chem* **275**, 14273-14280.
- Pethe, K., Alonso, S., Biet, F., Delogu, G., Brennan, M. J., Loch, C. & Menozzi, F. D. (2001a).** The heparin-binding haemagglutinin of *M. tuberculosis* is required for extrapulmonary dissemination. *Nature* **412**, 190-194.
- Pethe, K., Puech, V., Daffe, M., Josenhans, C., Drobecq, H., Loch, C. & Menozzi, F. D. (2001b).** *Mycobacterium smegmatis* laminin-binding glycoprotein shares epitopes with *Mycobacterium tuberculosis* heparin-binding haemagglutinin. *Mol Microbiol* **39**, 89-99.
- Pethe, K., Bifani, P., Drobecq, H., Sergheraert, C., Debrue, A. S., Loch, C. & Menozzi, F. D. (2002).** Mycobacterial heparin-binding hemagglutinin and laminin-binding protein share antigenic methyllysines that confer resistance to proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 10759-10764.
- Piddington, D. L., Kashkouli, A. & Buchmeier, N. A. (2000).** Growth of *Mycobacterium tuberculosis* in a defined medium is very restricted by acid pH and Mg(2+) levels. *Infect Immun* **68**, 4518-4522.
- Pugsley, A. P., Francetic, O., Driessen, A. J. & de Lorenzo, V. (2004).** Getting out: protein traffic in prokaryotes. *Mol Microbiol* **52**, 3-11.
- Pym, A. S., Brodin, P., Majlessi, L., Brosch, R., Demangel, C., Williams, A., Griffiths, K. E., Marchal, G., Leclerc, C. & Cole, S. T. (2003).** Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. *Nat Med* **9**, 533-539.
- Ragno, S., Romano, M., Howell, S., Pappin, D. J., Jenner, P. J. & Colston, M. J. (2001).** Changes in gene expression in macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*: a combined transcriptomic and proteomic approach. *Immunology* **104**, 99-108.
- Raja, A. (2004).** Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res* **120**, 213-232.
- Rao, M., Streur, T. L., Aldwell, F. E. & Cook, G. M. (2001).** Intracellular pH regulation by *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *Microbiology* **147**, 1017-1024.
- Raynaud, C., Etienne, G., Peyron, P., Laneelle, M. A. & Daffe, M. (1998).** Extracellular enzyme activities potentially involved in the pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* **144** ( Pt 2), 577-587.
- Raynaud, C., Papavinasasundaram, K. G., Speight, R. A., Springer, B., Sander, P., Bottger, E. C., Colston, M. J. & Draper, P. (2002).** The functions of OmpATb, a pore-forming protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **46**, 191-201.
- Reddy, S. K., Kamireddi, M., Dhanireddy, K., Young, L., Davis, A. & Reddy, P. T. (2001).** Eukaryotic-like adenyl cyclases in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: cloning and characterization. *J Biol Chem* **276**, 35141-35149.
- Reiling, N., Klug, K., Krallmann-Wenzel, U., Laves, R., Goyert, S., Taylor, M. E., Lindhorst, T. K. & Ehlers, S. (2001).** Complex encounters at the macrophage-mycobacterium interface: studies on the role of the mannose receptor and CD14 in experimental infection models with *Mycobacterium avium*. *Immunobiology* **204**, 558-571.
- Rickman, L., Scott, C., Hunt, D. M., Hutchinson, T., Menendez, M. C., Whalan, R., Hinds, J., Colston, M. J., Green, J. & Buxton, R. S. (2005).** A member of the cAMP receptor protein family of transcription regulators in *Mycobacterium tuberculosis* is required for virulence in mice and

controls transcription of the *rpfA* gene coding for a resuscitation promoting factor. *Mol Microbiol* **56**, 1274-1286.

**Rooyackers, A. W. & Stokes, R. W. (2005).** Absence of complement receptor 3 results in reduced binding and ingestion of *Mycobacterium tuberculosis* but has no significant effect on the induction of reactive oxygen and nitrogen intermediates or on the survival of the bacteria in resident and interferon-gamma activated macrophages. *Microb Pathog* **39**, 57-67.

**Rosen, H. (2004).** Bacterial responses to neutrophil phagocytosis. *Curr Opin Hematol* **11**, 1-6.

**Russell, D. G., Mwandumba, H. C. & Rhoades, E. E. (2002).** Mycobacterium and the coat of many lipids. *J Cell Biol* **158**, 421-426.

**Sambrook, J. E., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** *Molecular cloning: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Sander, P., B., S. & E.C., a. B. (2001).** Gene replacement in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG using *rpsL*<sup>+</sup> as a dominant negative selectable marker. In *Methods in Molecular Medicine: Mycobacterium tuberculosis Protocols*. Parish T., and Stoker, N. G. (eds). Totowa, New Jersey: Humana PRes., pp. 93-104.

**Sander, P., Prammananan, T., Meier, A., Frischkorn, K. & Bottger, E. C. (1997).** The role of ribosomal RNAs in macrolide resistance. *Mol Microbiol* **26**, 469-480.

**Sassetti, C. M. & Rubin, E. J. (2003).** Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12989-12994.

**Sassetti, C. M., Boyd, D. H. & Rubin, E. J. (2003).** Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol Microbiol* **48**, 77-84.

**Sechi, L. A., Ahmed, N., Felis, G. E., Dupre, I., Cannas, S., Fadda, G., Bua, A. & Zanetti, S. (2006).** Immunogenicity and cytoadherence of recombinant heparin binding haemagglutinin (HBHA) of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: Functional promiscuity or a role in virulence? *Vaccine* **24**, 236-243.

**Senior, A. E., Nadanaciva, S. & Weber, J. (2002).** The molecular mechanism of ATP synthesis by F1F0-ATP synthase. In *Biochim Biophys Acta*, pp. 188-211.

**Shenoy, A. R. & Visweswariah, S. S. (2004).** Class III nucleotide cyclases in bacteria and archaeobacteria: lineage-specific expansion of adenylyl cyclases and a dearth of guanylyl cyclases. *FEBS Lett* **561**, 11-21.

**Shenoy, A. R. & Visweswariah, S. S. (2006).** Mycobacterial adenylyl cyclases: Biochemical diversity and structural plasticity. *FEBS Lett* **580**, 3344-3352.

**Shenoy, A. R., Srinivasan, N., Subramaniam, M. & Visweswariah, S. S. (2003).** Mutational analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Rv1625c adenylyl cyclase: residues that confer nucleotide specificity contribute to dimerization. *FEBS Lett* **545**, 253-259.

**Shenoy, A. R., Sreenath, N. P., Mahalingam, M. & Visweswariah, S. S. (2005).** Characterization of phylogenetically distant members of the adenylate cyclase family from mycobacteria: Rv1647 from *Mycobacterium tuberculosis* and its orthologue ML1399 from *M. leprae*. *Biochem J* **387**, 541-551.

**Shibata, C., Ehara, T., Tomura, K., Igarashi, K. & Kobayashi, H. (1992).** Gene structure of *Enterococcus hirae* (*Streptococcus faecalis*) F1F0-ATPase, which functions as a regulator of cytoplasmic pH. *J Bacteriol* **174**, 6117-6124.

- Sinha, S. C., Wetterer, M., Sprang, S. R., Schultz, J. E. & Linder, J. U. (2005).** Origin of asymmetry in adenyl cyclases: structures of *Mycobacterium tuberculosis* Rv1900c. *Embo J* **24**, 663-673.
- Sismeiro, O., Trotot, P., Biville, F., Vivares, C. & Danchin, A. (1998).** *Aeromonas hydrophila* adenyl cyclase 2: a new class of adenyl cyclases with thermophilic properties and sequence similarities to proteins from hyperthermophilic archaeobacteria. *J Bacteriol* **180**, 3339-3344.
- Smith, I. (2003).** *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev* **16**, 463-496.
- Smith, R. S., Wolfgang, M. C. & Lory, S. (2004).** An adenylate cyclase-controlled signaling network regulates *Pseudomonas aeruginosa* virulence in a mouse model of acute pneumonia. *Infect Immun* **72**, 1677-1684.
- Sonnenberg, M. G. & Belisle, J. T. (1997).** Definition of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, N-terminal amino acid sequencing, and electrospray mass spectrometry. *Infect Immun* **65**, 4515-4524.
- Sorensen, A. L., Nagai, S., Houen, G., Andersen, P. & Andersen, A. B. (1995).** Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **63**, 1710-1717.
- Spreadbury, C. L., Pallen, M. J., Overton, T., Behr, M. A., Mostowy, S., Spiro, S., Busby, S. J. & Cole, J. A. (2005).** Point mutations in the DNA- and cNMP-binding domains of the homologue of the cAMP receptor protein (CRP) in *Mycobacterium bovis* BCG: implications for the inactivation of a global regulator and strain attenuation. *Microbiology* **151**, 547-556.
- Springer, B., Sander, P., Sedlacek, L., Ellrott, K. & Bottger, E. C. (2001).** Instability and site-specific excision of integration-proficient mycobacteriophage L5 plasmids: development of stably maintained integrative vectors. *Int J Med Microbiol* **290**, 669-675.
- Stahl, P. & Gordon, S. (1982).** Expression of a mannosyl-fucosyl receptor for endocytosis on cultured primary macrophages and their hybrids. *J Cell Biol* **93**, 49-56.
- Stanley, S. A., Raghavan, S., Hwang, W. W. & Cox, J. S. (2003).** Acute infection and macrophage subversion by *Mycobacterium tuberculosis* require a specialized secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13001-13006.
- Stokes, R. W., Norris-Jones, R., Brooks, D. E., Beveridge, T. J., Doxsee, D. & Thorson, L. M. (2004).** The glycan-rich outer layer of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis* acts as an antiphagocytic capsule limiting the association of the bacterium with macrophages. *Infect Immun* **72**, 5676-5686.
- Stover, C. K., de la Cruz, V. F., Fuerst, T. R., Burlein, J. E., Benson, L. A., Bennett, L. T., Bansal, G. P., Young, J. F., Lee, M. H., Hatfull, G. F. & et al. (1991).** New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* **351**, 456-460.
- Sturgill-Koszycki, S., Schlesinger, P. H., Chakraborty, P., Haddix, P. L., Collins, H. L., Fok, A. K., Allen, R. D., Gluck, S. L., Heuser, J. & Russell, D. G. (1994).** Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* **263**, 678-681.
- Susstrunk, U., Pidoux, J., Taubert, S., Ullmann, A. & Thompson, C. J. (1998a).** Pleiotropic effects of cAMP on germination, antibiotic biosynthesis and morphological development in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **30**, 33-46.
- Susstrunk, U., Pidoux, J., Taubert, S., Ullmann, A., Thompson, C. J., Gross, A., Bouaboula, M., Casellas, P., Liautard, J. P. & Dornand, J. (1998b).** Pleiotropic effects of cAMP on germination, antibiotic biosynthesis and morphological development in *Streptomyces coelicolor*

Subversion and utilization of the host cell cyclic adenosine 5'-monophosphate/protein kinase A pathway by *Brucella* during macrophage infection. *Mol Microbiol* **30**, 33-46.

**Tang, W. J. & Hurley, J. H. (1998).** Catalytic mechanism and regulation of mammalian adenylyl cyclases. *Mol Pharmacol* **54**, 231-240.

**Tellez-Sosa, J., Soberon, N., Vega-Segura, A., Torres-Marquez, M. E. & Cevallos, M. A. (2002).** The *Rhizobium etli* cyaC product: characterization of a novel adenylate cyclase class. *J Bacteriol* **184**, 3560-3568.

**Tesmer, J. J., Sunahara, R. K., Johnson, R. A., Gosselin, G., Gilman, A. G. & Sprang, S. R. (1999).** Two-metal-ion catalysis in adenylyl cyclase. *Science* **285**, 756-760.

**Tews, I., Findeisen, F., Sinning, I., Schultz, A., Schultz, J. E. & Linder, J. U. (2005).** The structure of a pH-sensing mycobacterial adenylyl cyclase holoenzyme. *Science* **308**, 1020-1023.

**Thanassi, D. G. & Hultgren, S. J. (2000).** Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 420-430.

**Tjelle, T. E., Lovdal, T. & Berg, T. (2000).** Phagosome dynamics and function. *Bioessays* **22**, 255-263.

**Tortoli, E. (2006).** The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunol Med Microbiol* **48**, 159-178.

**Tran, S. L. & Cook, G. M. (2005).** The F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>-ATP synthase of *Mycobacterium smegmatis* is essential for growth. *J Bacteriol* **187**, 5023-5028.

**Velasco-Velazquez, M. A., Barrera, D., Gonzalez-Arenas, A., Rosales, C. & Agramonte-Hevia, J. (2003).** Macrophage-*Mycobacterium tuberculosis* interactions: role of complement receptor 3. *Microb Pathog* **35**, 125-131.

**Vergne, I., Chua, J., Singh, S. B. & Deretic, V. (2004).** Cell biology of *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 367-394.

**Vergne, I., Chua, J., Lee, H. H., Lucas, M., Belisle, J. & Deretic, V. (2005).** Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4033-4038.

**Vieira, O. V., Botelho, R. J. & Grinstein, S. (2002).** Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem J* **366**, 689-704.

**Villeneuve, C., Gilleron, M., Maridonneau-Parini, I., Daffe, M., Astarie-Dequeker, C. & Etienne, G. (2005).** Mycobacteria use their surface-exposed glycolipids to infect human macrophages through a receptor-dependent process. *J Lipid Res* **46**, 475-483.

**WHO (2005).** Tuberculosis - The Global Burden. *Global TB Factsheet 2005*.

**WHO (2006).** Fact sheet no. 104.

**Wolfgang, M. C., Lee, V. T., Gilmore, M. E. & Lory, S. (2003).** Coordinate regulation of bacterial virulence genes by a novel adenylate cyclase-dependent signaling pathway. *Dev Cell* **4**, 253-263.

**Yahr, T. L., Vallis, A. J., Hancock, M. K., Barbieri, J. T. & Frank, D. W. (1998).** ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13899-13904.

**Yan, L. & Cirillo, J. D. (2004).** Infection of murine macrophage cell lines by *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiol Lett* **230**, 147-152.

**Yoshida, M., Muneyuki, E. & Hisabori, T. (2001).** ATP synthase--a marvellous rotary engine of the cell. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 669-677.

**Young, D. B. & Garbe, T. R. (1991).** Lipoprotein antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Res Microbiol* **142**, 55-65.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
AC	Adenylat Cyclase
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosinmonophosphat
AP	Alkalische Phosphatase
Aph	Aph-Kassette
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BCG	Bacille Calmette-Guérin
BMDM	Knochenmarkszellen differenzierte Makrophagen ( <i>Bone Marrow Derived Macrophages</i> )
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
bzw.	Beispielsweise
C	Elektrische Kapazität
ca.	ungefähr
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cAMP	zyklisches AMP
CFU	koloniebildende Einheit ( <i>Colony forming units</i> )
Cm	Chloramphenicol
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
d	Tag
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	Dulbeccos Modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuraciltriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EB	Elutions Puffer ( <i>elution buffer</i> )

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	Et altera; und andere
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	Fötales Kälberserum ( <i>Fetal Calf Serum</i> )
fmol	Femtomol
g	Gramm
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HA	Influenza Hämagglutinin Protein
HCl	Salzsäure
Hyg	Hygromycin B
i.p.	intraperitoneal
i.t.	intratracheal
i.v.	intravenös
IPTG	1-Isopropyl-β-1-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
ko	knockout
kV	Kilovolt
kΩ	Kiloohm
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LCCM	L-cell conditioned Medium
M	Molar
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>
MDR	Multiresistenz ( <i>multidrug resistant</i> )
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
MOI	Multiplizität der Infektion
MST	Maximale Überlebenszeit ( <i>mean survival time</i> )
N	Normal
Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Dinatriumdihydrogenphosphat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid

NaOH	Natronlauge
NaPO <sub>4</sub>	Natriumphosphat
ng	Nanogramm
nt	Nukleotide
°C	Grad Celsius
OD	Optische Dichte
ORF	Offenes Leseraster ( <i>open reading frame</i> )
p.A.	pro Analysis (Analyserein)
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerasen-Kettenreaktion
PDVF	Polyvinylidenfluorid
pH	Konzentration der H <sup>+</sup> -Ionen in einer Lösung, pH Wert
pmol	Pikomol
R	Elektrischer Widerstand oder Resistenz
RD	<i>region of difference</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
sco	<i>single crossover</i>
SD	Standardabweichung ( <i>Standard deviation</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SM	Streptomycin
SPF	Spezifisch Pathogen frei
T <sub>a</sub>	Anlagerungs-Temperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung ( <i>Tris buffered Saline</i> )
TBST	Tris gepufferte Kochsalzlösung mit Tween ( <i>Tris buffered Saline-Tween</i> )
TE	Tris-EDTA
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
U	Elektrische Spannung oder Enzymeinheit (Unit)
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
Vol.	Volumen
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit ( <i>weight per volume</i> )
WHO	Weltgesundheitsorganisation ( <i>world health organisation</i> )



wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel
$\mu$ F	Mikrofarad

## 7.2 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1-1 Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>M. tuberculosis</i> Quelle: <a href="http://www.uct.ac.za/depts/mmi/lsteyn/bacteria.html">www.uct.ac.za/depts/mmi/lsteyn/bacteria.html</a>	4
Abbildung 1-2 Dimerstruktur der katalytischen Domäne von Klasse III Adenylatcyclasen	10
Abbildung 1-3 Schematische Übersicht der Sekretionssysteme des Typs I bis IV	14
Abbildung 1-4 Schematische Übersicht des Typ V Sekretionssystems	15
Abbildung 1-5 Darstellung der Struktur eines $F_0F_1$ -ATPase-Komplexes aus <i>E. coli</i>	17
Abbildung 1-6 Darstellung möglicher Aufnahmemechanismen von <i>M. tuberculosis</i> in die Wirtszelle	19
Abbildung 4-1 Genotypische Charakterisierung von <i>M. tuberculosis</i> Rv1264Δ	58
Abbildung 4-2 Wachstumskurve von <i>M. tuberculosis</i> H37Rv und <i>M. tuberculosis</i> Rv1264Δ	59
Abbildung 4-3 <i>In vivo</i> Infektionsverlauf von <i>M. tuberculosis</i> H37Rv und <i>M. tuberculosis</i> Rv1264Δ in C57BL/6 Mäusen nach aerogener Infektion	60
Abbildung 4-4 HE gefärbte Lungengewebschnitte von C57BL/6 Mäusen nach aerogener Infektion mit <i>M. tuberculosis</i> H37Rv und <i>M. tuberculosis</i> Rv1264Δ, Vergrößerung: 4fach	61
Abbildung 4-5 Genotypische Charakterisierung von <i>M. tuberculosis</i> cyaΔ	63
Abbildung 4-6 Wachstumskurve von <i>M. tuberculosis</i> H37Rv und <i>M. tuberculosis</i> cyaΔ	63
Abbildung 4-7 <i>In vivo</i> Infektionsverlauf von <i>M. tuberculosis</i> H37Rv und <i>M. tuberculosis</i> cyaΔ in C57BL/6 Mäusen nach aerogener Infektion	64
Abbildung 4-8 HE gefärbte Lungengewebschnitte von C57BL/6 Mäusen nach aerogener Infektion mit <i>M. tuberculosis</i> H37Rv und <i>M. tuberculosis</i> cyaΔ, Vergrößerung: 4fach	64
Abbildung 4-9 Genotypische Charakterisierung von <i>M. tuberculosis</i> Rv1264Δ/cyaΔ	65
Abbildung 4-10 Wachstumskurve von <i>M. tuberculosis</i> H37Rv und <i>M. tuberculosis</i> Rv1264Δ/cyaΔ	66
Abbildung 4-11 Relative Vermehrungsrate von <i>M. tuberculosis</i> H37Rv und <i>M. tuberculosis</i> Rv1264Δ/cyaΔ in BMDM	66
Abbildung 4-12 <i>In vivo</i> Infektionsverlauf von <i>M. tuberculosis</i> H37Rv und <i>M. tuberculosis</i> Rv1264Δ/cyaΔ in C57BL/6 Mäusen nach aerogener Infektion	67
Abbildung 4-13 HE gefärbte Lungengewebschnitte von C57BL/6 Mäusen nach aerogener Infektion mit <i>M. tuberculosis</i> H37Rv und <i>M. tuberculosis</i> Rv1264Δ/cyaΔ, Vergrößerung: 4fach	68
Abbildung 4-14 Southern Blot Analyse von genomischer DNA <i>M. tuberculosis</i> atpD	70
Abbildung 4-15 Schematische Darstellung der atpD Fusionskonstrukte	71
Abbildung 4-16 Genotypische Charakterisierung von <i>M. tuberculosis</i> hbhAΔ	76
Abbildung 4-17 Darstellung des <i>in vivo</i> Infektionsverlauf von <i>M. tuberculosis</i> H37Rv und <i>M. tuberculosis</i> hbhAΔ in C57BL/6 Mäusen nach intratrachealer Infektion	78
Abbildung 4-18 Darstellung des <i>in vivo</i> Infektionsverlauf von <i>M. tuberculosis</i> H37Rv und <i>M. tuberculosis</i> hbhAΔ in C57BL/6 Mäusen nach intravenöser Infektion	78
Abbildung 4-19 Darstellung des Langzeitüberlebens von C57BL/6 Mäusen nach intravenöser Infektion mit <i>M. tuberculosis</i> H37Rv und <i>M. tuberculosis</i> hbhAΔ	79
Abbildung 4-20 Darstellung der Wachstumskurve von <i>M. tuberculosis</i> H37Rv, <i>M. tuberculosis</i> hbhAΔ und <i>M. tuberculosis</i> hbhAΔ Komplementation	80
Abbildung 4-21 Darstellung der relativen Phagozytoserate von <i>M. tuberculosis</i> H37Rv und <i>M. tuberculosis</i> hbhAΔ in BMDM	80
Abbildung 4-22 Darstellung der relativen Vermehrungsrate von <i>M. tuberculosis</i> H37Rv, <i>M. tuberculosis</i> hbhAΔ und <i>M. tuberculosis</i> Komplementation hbhAΔ in BMDM	83
Abbildung 4-23 Darstellung des Einflusses von Heparin auf die Phagozytoserate von BMDM	84

Tabelle 1-1 Medizinisch bedeutsame Spezies von Mykobakterien und die von ihnen verursachten Erkrankungen	3
Tabelle 1-2 AC von <i>M. tuberculosis</i>	11
Tabelle 2-1 Übersicht der verwendeten DNA-Sonden	27
Tabelle 2-2 Übersicht der verwendeten Antikörper	27
Tabelle 2-3 Übersicht der verwendeten PCR-Primer	28
Tabelle 2-4 Übersicht der verwendeten Sequenzier-Primer	29
Tabelle 2-5 Übersicht der verwendeten Bakterienstämme	30
Tabelle 2-6 Übersicht der verwendeten bakteriellen Plasmide	31
Tabelle 2-7 Übersicht der verwendeten Zelllinien	36
Tabelle 2-8 Primäre Zellen	36
Tabelle 2-9 Mausstämme	36
Tabelle 4-1 Rekombinationsfrequenz von <i>M. tuberculosis atpD sco</i>	70
Tabelle 4-2 Übersicht der generierten Expressionskonstrukte	72
Tabelle 4-3 Übersicht der in <i>M. bovis</i> BCG und <i>M. tuberculosis</i> getesteten Konstrukte	74
Tabelle 4-4 Phagozytoserate und phagozytischer Anteil	82

## 7.3 Lebenslauf

Name: Hombach, geb. Dittrich  
Vorname: Dorothea Maria  
Geboren am: 30.11.1975  
Nationalität: Deutsch

### Ausbildung:

1982 bis 1989 Polytechnische Oberschule 41, Potsdam, Deutschland  
1989 bis 1996 Gymnasium Theodorianum, Paderborn, Deutschland  
Abschluss: Abitur  
1996 bis 2002 Diplom Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität  
Würzburg, Deutschland  
Diplomarbeit am Institut für Molekulare Infektionsbiologie: „Molekulare  
Mechanismen der Genomvariabilität pathogener Staphylokokken“;  
seit 2002 Universität Zürich, Institut für Medizinische Mikrobiologie

### Publikationen:

Guo, Y. L.; Kurz, U.; Schultz, A.; Linder, J. U.; Dittrich, D.; Keller, C.; Ehlers, S.; Sander, P.;  
Schultz, J. E., (2005). Interaction of Rv1625c, a mycobacterial class IIIa adenylyl cyclase, with a  
mammalian congener; *Mol Microbiol* 57, 667-77.

Dittrich, D.; Keller, C.; Ehlers, S.; Schultz, J. E., Sander, P.; (2006) Characterization of a  
*Mycobacterium tuberculosis* mutant deficient in pH sensing adenylate cyclase Rv1264; *Int. J. Med.*  
*Microbiol.*, 296, 563-66.

Mischenko, V.V.\*; Dittrich, D.\*; Rampini S.K.\*; Majorov, K.B.; Scheglov, I.V; Böttger, E.B.; Apt, A.S;  
Sander, P. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* HbhA as a principal adhesion for  
professional phagocytes; eingereicht zur Publikation; \* gleichberechtigte Erstautoren

### Konferenzpräsentationen:

2005 DGHM/VAAM, Göttingen, Deutschland  
  
Poster: „Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* pH-sensing adenylyl  
cyclase Rv1264 knock-out mutant“  
  
Poster: “*Mycobacterium tuberculosis* HbhA mediates uptake in professional  
phagocytes”

- 2005 SWIMM, Zürich, Schweiz
- Vortrag: "*Mycobacterium tuberculosis* HbhA mediates uptake in neutrophilic granulocytes"
- Poster: "Inactivation of the mammalian-like adenylyl cyclase *cya* and the induced adenylyl cyclase Rv1264 in *Mycobacterium tuberculosis*"
- 2005 Keystone-Symposia, Whistler, Kanada
- Poster: "Inactivation of the mammalian-like adenylyl cyclase *cya* of *Mycobacterium tuberculosis*"
- 2005 SGM, Genf, Schweiz
- Poster: "Generation and characterisation of the *Mycobacterium tuberculosis* mutant deficient in mammalian-like adenylyl cyclase *cya*"
- Poster: "*Mycobacterium tuberculosis* HbhA mediates uptake in neutrophilic granulocytes"
- 2004 SGM, Lugano, Schweiz
- Poster: "*Mycobacterium tuberculosis ompA* interferes with phagosome maturation"

## **7.4 Publikationen**

# Interaction of Rv1625c, a mycobacterial class IIIa adenylyl cyclase, with a mammalian congener

Ying Lan Guo,<sup>1</sup> Ursula Kurz,<sup>1</sup> Anita Schultz,<sup>1</sup>  
Jürgen U. Linder,<sup>1</sup> Dorothea Dittrich,<sup>2</sup>  
Christine Keller,<sup>3</sup> Stefan Ehlers,<sup>3</sup> Peter Sander<sup>2</sup> and  
Joachim E. Schultz<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Abt. Pharmazeutische Biochemie, Pharmazeutisches Institut, Universität Tübingen, Morgenstelle 8, D-72076 Tübingen, Germany.

<sup>2</sup>Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universität Zürich, Gloriastr. 30/32, CH-8006 Zürich, Switzerland.

<sup>3</sup>Molecular Infection Biology, Research Center Borstel, Parkallee 22, D-23845 Borstel, Germany.

## Summary

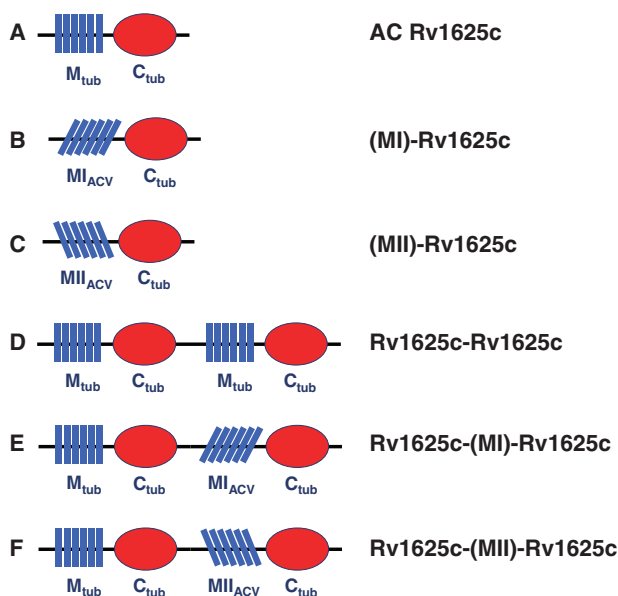
The adenylyl cyclase Rv1625c from *Mycobacterium tuberculosis* codes for a protein with six transmembrane spans and a catalytic domain, i.e. it corresponds to one half of the pseudoheterodimeric mammalian adenylyl cyclases (ACs). Rv1625c is active as a homodimer. We investigated the role of the Rv1625c membrane domain and demonstrate that it efficiently dimerizes the protein resulting in a 7.5-fold drop in  $K_m$  for ATP. Next, we generated a duplicated Rv1625c AC dimer by a head-to-tail concatenation. This produced an AC with a domain order exactly as the mammalian pseudoheterodimers. It displayed positive cooperativity and a 60% increase of  $v_{max}$  compared with the Rv1625c monomer. Further, we probed the compatibility of mycobacterial and mammalian membrane domains. The second membrane anchor in the Rv1625c concatamer was replaced with membrane domain I or II of rabbit type V AC. The mycobacterial and either mammalian membrane domains are compatible with each other and both recombinant proteins are active. A *M. tuberculosis* Rv1625c knockout strain was assayed in a mouse infection model. *In vitro* growth characteristics and *in vivo* organ infection and mortality were unaltered in the knockout strain indicating that AC Rv1625c alone is not a virulence factor.

## Introduction

Cyclic AMP (cAMP) is a universal signal molecule that is present in virtually all organisms. This ubiquity accounts for the scientific interest devoted to adenylyl cyclases (ACs) which are responsible for the biosynthesis of cAMP. Thus far, ACs have been classified into six classes which appear unrelated in their primary structure (Barzu and Danchin, 1994; Sismeiro *et al.*, 1998; Cotta *et al.*, 1998; Tellez-Sosa *et al.*, 2002). In *Mycobacterium tuberculosis* 15 genes code for class III ACs of variant domain compositions (Cole *et al.*, 1998; McCue *et al.*, 2000). This large panel of ACs suggests that cAMP formation may contribute to pathogenesis, e.g. by interfering with the macrophage-intrinsic signal transduction system. This hypothesis is supported by the observation that cAMP levels are elevated in cultured macrophages which have ingested living mycobacteria but not in those which have ingested dead bacteria (Lowrie *et al.*, 1975).

Here, we deal with the mycobacterial AC encoded by the gene *cya*, designated as Rv1625c (DDBJ/EMBL/GenBank Accession No. AF017731). It corresponds exactly to one half of the nine membrane-bound, pseudoheterodimeric ACs present in mammals. The latter consist of two diverged membrane domains with six transmembrane spans each (MI and MII) and two conserved catalytic domains (C1a, C2) following each membrane anchor. The MIC1a and MIIc2 segments are joined in tandem by a linker termed C1b and form an active pseudoheterodimer (Krupinski *et al.*, 1989). The membrane anchors account for about 40% of the proteins and interact in an isoform-specific manner (Seebacher *et al.*, 2001). Regulatory signals directly acting on the membrane domains are unknown (Linder and Schultz, 2003). The mammalian ACs are pseudosymmetric with one catalytic site and a degenerate second site. Rv1625c is active as a homodimer with two active sites (Guo *et al.*, 2001). The catalytic domain of Rv1625c has 40% similarity to C1a from dog AC type V and 45% to C2 from rat AC type II which were co-crystallized. The six canonical catalytic amino acids are conserved in register in Rv1625c (Tesmer *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997; Guo *et al.*, 2001). An alignment of the AC Rv1625c membrane spans with MI or MII of rabbit type V AC revealed no significant similarity. This indicates that the mycobacterial and mammalian AC

Accepted 1 April, 2005. \*For correspondence. E-mail joachim.schultz@uni-tuebingen.de; (+49) 7071 297 2475; Fax: (+49) 7071 295 952.



**Fig. 1.** Schemes of protein constructs used in this study. The catalytic domain of the mycobacterial AC Rv1625c comprises residues 204–443. Membrane domain I (MI) and membrane domain II (MII) from the rabbit type V AC (GenBank Accession No. Z29371) correspond to residues 245–398 and 768–1008 respectively. All constructs contain the cytosolic mycobacterial N-terminal residues 1–46. A scheme how the catalytic domains are formed is in Guo *et al.* (2001).

membrane domains either do not share a common ancestor or that they have degenerated beyond recognition. Although many biochemical properties of the catalytic homodimer of AC Rv1625c resemble those of mammalian ACs (Guo *et al.*, 2001), the generation of an active cyclase dimer from a mammalian and an AC Rv1625c catalytic domain is not possible (Linder *et al.*, 2004a). This indicates incompatible structural differences which preclude a productive interaction of the mycobacterial and mammalian catalytic domains.

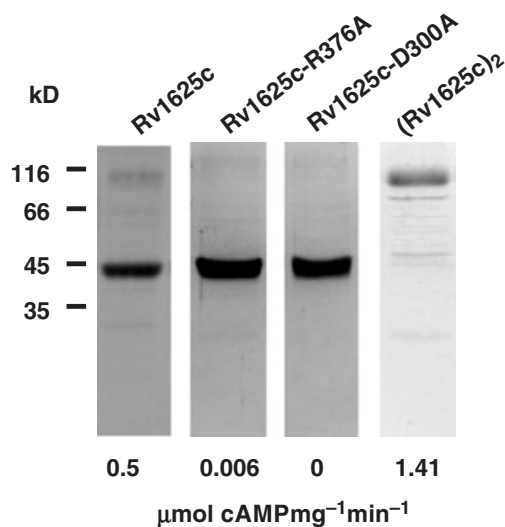
We asked whether the membrane domain of AC Rv1625c in addition to targeting the protein to the membrane may contribute directly to enzyme activity, e.g. by enhancing dimerization. In an attempt to assess the potential progenitor – successor relationship of AC Rv1625c and its mammalian congeners we further asked whether a mammalian-like pseudoheterodimeric AC can be generated from Rv1625c. Further to this point we wished to study the potential interaction of mycobacterial and mammalian membrane domains in chimeric ACs and find out by generation of an Rv1625c gene knockout strain of the infectious *M. tuberculosis* H37Rv whether Rv1625c has a direct bearing on virulence and pathogenicity because alterations in cAMP levels might orchestrate bacterial adaptations through regulation of gene expression during different states of infection. Alternatively, cAMP

produced by *M. tuberculosis* might interfere with host cell defence pathways.

## Results

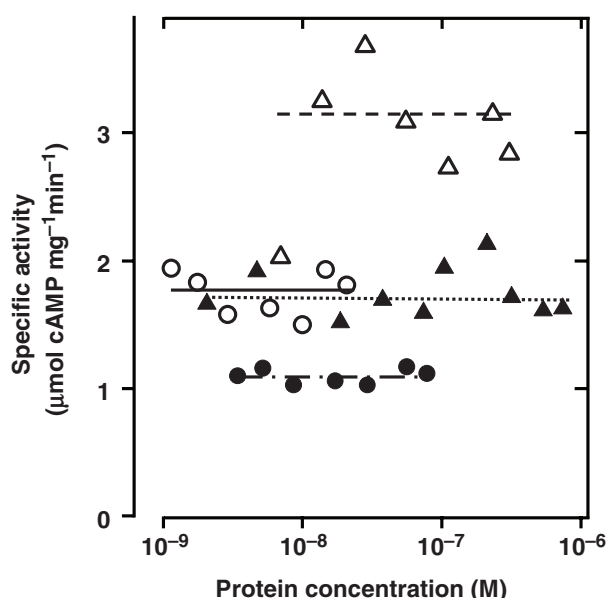
### Characterization of adenyl cyclase Rv1625c

We expressed the N-terminally His-tagged AC Rv1625c holoenzyme in *Escherichia coli* (Fig. 1). After isolation of membranes and solubilization with 1% polydocanol the protein was purified by Ni-NTA chromatography (Fig. 2). The specific activity of the holoenzyme was independent of protein concentration over the testable range (Fig. 3) in contrast to the isolated catalytic domain Rv1625c<sub>204–443</sub> which has a  $K_{\text{diss}}$  of 2  $\mu\text{M}$  (Guo *et al.*, 2001). Obviously, the membrane anchor dimerizes already at nM concentrations. Because AC measurements below  $5 \times 10^{-9}$  M protein were technically unfeasible, no dissociation constants for the holoenzyme could be determined. It had a pH optimum of 7.5 (tested range 4–9.5),  $K_m$  values of 20 and 440  $\mu\text{M}$  ATP with  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  as cations, respectively, and a  $v_{\text{max}}$  of 2.1  $\mu\text{mol cAMP mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  ( $\text{Mn}^{2+}$  ATP as a substrate; Table 1). These values were similar to those reported for the isolated catalyst (Guo *et al.*, 2001) demonstrating that a major function of the membrane anchor is a gain in dimerization efficiency. Obviously, the catalytic domain alone as a truncated version of Rv1625c cannot coalesce equally effective into a catalyst although otherwise it displays all enzymatic properties of a canon-



**Fig. 2.** Purity of recombinant AC Rv1625c holoenzyme, mutants and linked dimer (Rv1625c)<sub>2</sub>. 12.5% SDS-PAGE; coomassie blue staining; molecular mass standards on the left. Amounts of proteins loaded were 2.5  $\mu\text{g}$  of AC Rv1625c; 4.5  $\mu\text{g}$  of Rv1625c-R376A; 3.5  $\mu\text{g}$  of Rv1625c-D300A; 2  $\mu\text{g}$  of (Rv1625c)<sub>2</sub>. The specific activities assayed at 75  $\mu\text{M}$   $\text{Mn}^{2+}$  ATP and 40 nM AC Rv1625c, 1  $\mu\text{M}$  mutant proteins and 15 nM (Rv1625c)<sub>2</sub> are given below each lane.





**Fig. 3.** The specific activities of all constructs containing a membrane domain are independent of the protein concentration. ( $\blacktriangle$ ), AC Rv1625c; ( $\triangle$ ) (Rv1625c) $_2$ ; ( $\bullet$ ) Rv1625c-(MI)-Rv1625c; ( $\circ$ ), Rv1625c-(MII)-Rv1625c. Assays were carried out with 850  $\mu$ M Mn $^{2+}$ -ATP for 4 min.

ical class III AC (Guo *et al.*, 2001). The absence of the membrane domain did not result in a partially misfolded protein because the catalytic fold itself delicately participates in dimerization (see also Sinha *et al.*, 2005).

Previously, we have shown that a canonical metal coordinating aspartate when mutated to alanine (D300A) in the AC Rv1625c catalytic domain functionally generated a mammalian C2 domain. Similarly, mutation of a transition-state stabilizing arginine in Rv1625c to alanine (R376A) generated a mammalian AC C1a equivalent. Those mutants are individually inactive, but when mixed reconstitute a single catalytic site with wild-type AC activity (Guo *et al.*, 2001). Now, we made two similarly complementary Rv1625c holoenzyme point mutants, Rv1625c-D300A, equivalent to a mammalian MIIC2 unit and Rv1625c-R376A as an equivalent for a mammalian MIC1a unit, to characterize the interaction of the membrane domains (Fig. 1). Both proteins were expressed, solubilized and purified to SDS-PAGE homogeneity by Ni-NTA chromatography (Fig. 2). We then investigated whether the attached membrane anchor allows or promotes complementation.

Rv1625c-D300A was inactive up to 10  $\mu$ M and Rv1625c-R376A had a residual activity of 6 nmol cAMP mg $^{-1}$  min $^{-1}$ , i.e. 1.2% of wild-type activity (Fig. 4A). Upon titration of 45 nM Rv1625c-R376A with Rv1625c-D300A only 12% of activity was reconstituted compared with wild-type activity (1.7  $\mu$ mol cAMP mg $^{-1}$  min $^{-1}$ ; Fig. 4A). Pre-incubation of the mutant mix at 30°C for up

to 20 min increased the reconstitution efficiency only marginally. Most likely the individual mutant proteins were stably dimerized by their membrane anchors and this prevented the interchange of monomers required for formation of an active fold. Similarly, an attempt to reconstitute activity with 45 nM of the membrane-containing Rv1625c-R376A mutant and 10  $\mu$ M of the complementary soluble catalytic Rv1625c $_{204-443}$ -D300A mutant was for the most part unsuccessful. The apparent  $v_{\max}$  was only 0.11  $\mu$ mol cAMP mg $^{-1}$  min $^{-1}$  or 6.4% of wild-type activity (Fig. 4A). Finally, we determined the dimerization of the AC Rv1625c holoenzyme and individual mutant proteins by cross-linking with glutaraldehyde (Fig. 4B). After 20 s about 40% was cross-linked and after 10 min 100% of the protein appeared as a dimer on a Western blot, monomers were absent and no higher oligomers were detected (Fig. 4B). Taken together this demonstrated that AC Rv1625c holoenzyme, wild type as well as individual mutant proteins, was efficiently and stably dimerized via their membrane domains. The failure to fully reconstitute enzyme activity from individually inactive monomers therefore resulted from the slow monomer interchange.

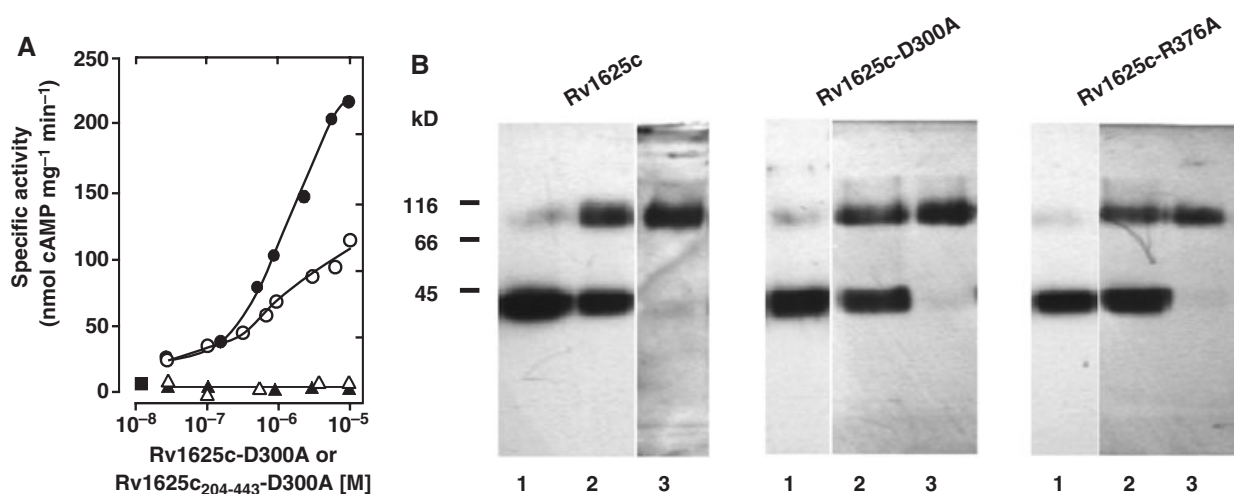
#### Generation of a mammalian-like AC from the Rv1625c AC holoenzyme

So far membrane-bound mammalian AC holoenzymes, MIC1-MIIC2, cannot be successfully expressed in *E. coli* and this restricted the biochemical investigation of this key molecule in an unabridged version. In view of the similarity in sequence and structure of the homodimeric and pseudoheterodimeric class III AC catalytic centres (Sinha *et al.*, 2005; Steegborn *et al.*, 2005), it was obvious to ask what are the evolutionary advantages of the tandem composition of mammalian ACs compared with the one membrane anchor and one catalytic domain topology such as in AC Rv1625c. Therefore, we created a mammalian-like AC consisting only of mycobacterial building blocks by joining the C-terminus of one AC Rv1625c molecule to the N-terminus of a second one resulting in (Rv1625c) $_2$  (see

**Table 1.** Kinetic characterization of adenylyl cyclase constructs.

Enzyme	$K_m$ ( $\mu$ M)	$v_{\max}$ ( $\mu$ mol cAMP mg $^{-1}$ min $^{-1}$ )	Hill coefficient
Rv1625c $_{(204-443)}$	150	2.1	1.1
Rv1625c	20	2.1	1.0
(Rv1625c) $_2$	16	3.5	1.3
Rv1625c-(MI)-Rv1625c	14	1.3	1.2
Rv1625c-(MII)-Rv1625c	12	3.4	1.2

Assays were carried out at 12 nM AC Rv1625c, 7 nM (Rv1625c) $_2$ , 6.8 nM Rv1625c-(MI)-Rv1625c and 6.5 nM Rv1625c-(MII)-Rv1625c. The kinetic parameters were derived by Hanes Woolfe linearization. Values for the catalytic domain alone (Rv1625c $_{204-443}$ ) are given for comparison.



**Fig. 4.** Reconstitution of adenylyl cyclase activity from holoenzyme mutants and Western blot analysis.

A. 45 nM Rv1625c-R376A was titrated with Rv1625c-D300A (●) and with Rv1625c<sub>204-443</sub>-D300A (○). Unpaired control incubations were 45 nM Rv1625c-R376A (■); Rv1625c-D300A (▲) and Rv1625c-D300A<sub>204-443</sub> (△). Assays were with 850 μM Mn<sup>2+</sup>-ATP for 4 min.

B. Glutaraldehyde (14 mM) induced dimerization of AC Rv1625c (29 nM), Rv1625c-D300A (30 nM), Rv1625c-R376A (27 nM); (1) 0 min cross-linking reaction, (2) 20 s and (3), 10 min. A specific antibody directed against Rv1625c<sub>204-443</sub> was used.

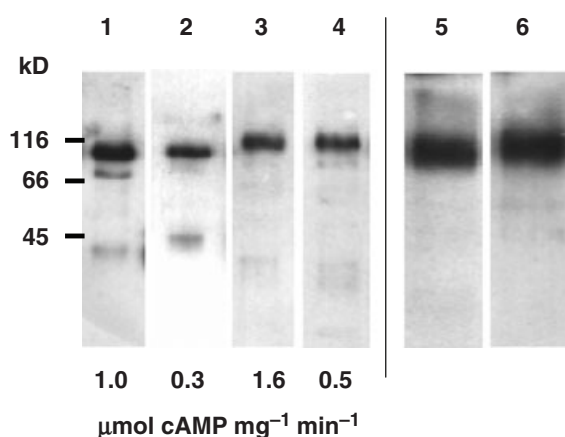
Fig. 1D for scheme of domain composition). The 96 kDa protein was expressed in *E. coli* as a membrane protein. After membrane isolation and solubilization with 1% poly-docanol (Rv1625c)<sub>2</sub> was purified by Ni-NTA affinity chromatography to homogeneity (Fig. 2). As expected, AC activity was linear with the protein concentration (Fig. 3). The  $K_m$  for Mn<sup>2+</sup> ATP was 16 μM and  $v_{max}$  was 3.5 μmol cAMP mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, i.e. 60% higher than for the monomer (Table 1). A Hill coefficient of 1.3 indicated positive cooperativity (Table 1). This proved that a mammalian-like AC can be expressed in *E. coli*, be targeted to the cell membrane and correctly assembled in the lipid bilayer as an active entity. The kinetic parameters suggested that the tandem topology promotes formation and stabilization of the catalytic fold, enhances cooperativity between the two active sites and increases the catalytic activity and the affinity for ATP as a substrate.

#### *The mycobacterial membrane domain is compatible with mammalian membrane domains*

Initially, we constructed two chimeric proteins, in which the mycobacterial membrane anchor was replaced by either MI or MII from rabbit type V AC. In these constructs residues 1–46 of the AC Rv1625c N-terminus which is cytosolic were retained to facilitate expression. (MI)-Rv1625c (49.4 kDa) consisted of residues 1–46 from AC Rv1625c, residues 245–398, i.e. the first six transmembrane spans from rabbit type V AC, and the mycobacterial catalytic domain (residues 204–443; see Fig. 1B for scheme of domain composition). The second construct contained residues 768–1008, i.e. the second membrane

domain from rabbit type V AC, (MII)-Rv1625c, with a molecular mass of 59 kDa due to the more extended loop regions between individual transmembrane spans (see Fig. 1C for scheme of domain composition). After purification a Western blot showed them to be intact (data not shown). Both (MI)-Rv1625c and (MII)-Rv1625c were inactive although cross-linking experiments established that each protein did homodimerize (data not shown). The inactivity of the (MI)-Rv1625c and (MII)-Rv1625c proteins most likely resulted from the replacement of the mycobacterial membrane domain which impaired assembly of an active catalytic fold. Further, we were unable to see AC activity upon mixing of (MI)-Rv1625c and (MII)-Rv1625c proteins albeit the membrane anchors originated from the same AC isozyme. This failure may again indicate the inability of a monomer interchange as described above for the Rv1625c-D300A and Rv1625c-R376A proteins. The findings are in agreement with functional assays and data from fluorescence resonance energy transfer (Seebacher *et al.*, 2001; Gu *et al.*, 2002).

Next, we generated the chimeric concatamer Rv1625c-(MI)-Rv1625c. In this derivative of (Rv1625c)<sub>2</sub> the second membrane domain was replaced by MI of type V AC (see Fig. 1E for scheme of domain composition). The amino acid boundaries were as described above for (MI)-Rv1625c. Rv1625c-(MI)-Rv1625c was expressed in *E. coli* and the 97 kDa protein was purified (Fig. 5). The specific activity at 75 μM ATP was 1.0 μmol cAMP mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, i.e. about 40% less than that of (Rv1625c)<sub>2</sub>. Is the intramolecular compatibility of the different membrane domains the cause for formation of an active catalytic interface or does dimerization of the catalytic halves pro-



**Fig. 5.** Western blot analysis of Rv1625c chimeras. (1) 16 ng Rv1625c-(MI)-Rv1625c; (2) 9 ng Rv1625c-D300A-(MI)-Rv1625c-R376A; (3) 10 ng Rv1625c-(MII)-Rv1625c; (4) 10 ng Rv1625c-D300A-(MII)-Rv1625c-R376A. The specific activities determined at 850  $\mu$ M  $Mn^{2+}$ -ATP and 10 nM proteins are indicated below. (5) and (6) Rv1625c-(MI)-Rv1625c and Rv1625c-(MII)-Rv1625c after cross-linking with 14 mM glutaraldehyde for 10 min. Note that cross-linking did not occur.

ceed intermolecularly between two different protein entities? To answer this question we linked Rv1625c-D300A (an inactive MIIC2 equivalent) and (MI)-Rv1625c-R376A (an inactive MIC1a equivalent) tail to head creating Rv1625c-D300A-(MI)-Rv1625c-R376A. For AC activity to occur the mycobacterial and mammalian membrane anchors now must interact to enable formation of a single catalytic site from individually inactive catalytic halves, while an intermolecular interaction between two mycobacterial or two mammalian membrane domains would result in the assembly of an unproductive dimer. Rv1625c-D300A-(MI)-Rv1625c-R376A was expressed and purified (Fig. 5). The specific activity of 300 nmol cAMP  $mg^{-1}$   $min^{-1}$  corresponded to 30% of the respective wild type which, however, forms two catalytic sites (Fig. 5). In effect then, 60% of recoverable AC activity was regained. Further, attempts to cross-link the recombinant protein with 14 mM glutaraldehyde did not yield dimers or oligomers (Fig. 5). In summary, we conclude that the mycobacterial and the MI domain of rabbit ACV were functionally compatible with each other.

Similarly, we generated chimeras using MII from type V AC as a second transmembrane anchor, i.e. Rv1625c-(MII)-Rv1625c and the mutant protein Rv1625c-D300A-(MII)-Rv1625c-R376A (see Fig. 1F for scheme of domain composition). The domain boundaries around MII were those described above for (MII)-Rv1625c. Both proteins were expressed in *E. coli*, purified by Ni-NTA chromatography and a Western blot showed the undegraded 106 kDa protein (Fig. 5). The specific activity of Rv1625c-(MII)-Rv1625c was 1.6  $\mu$ mol cAMP  $mg^{-1}$   $min^{-1}$  and that

of Rv1625c-D300A-(MII)-Rv1625c-R376A was 0.5  $\mu$ mol cAMP  $mg^{-1}$   $min^{-1}$ . Considering that the mutant protein can only form a single catalytic site, recovery of activity was 64%, i.e. as observed for Rv1625c-D300A-(MI)-Rv1625c-R376A. Protein dependency of activity of Rv1625c-(MII)-Rv1625c was linear and dimerization or oligomerization was excluded as probed by a Western blot after incubation with 14 mM glutaraldehyde for 10 min as a cross-linking reagent (Fig. 5). The kinetic characteristics of Rv1625c-(MI)-Rv1625c and Rv1625c-(MII)-Rv1625c were comparable to those of (Rv1625c)<sub>2</sub> (Table 1). Thus, the mycobacterial and mammalian type V AC membrane domains are compatible with each other and position the catalytic halves correctly for formation of the catalytic fold.

Earlier reports showed possible monomer/dimer transitions of mammalian pseudoheterodimers and immunoprecipitation of functional oligomers of recombinant type I AC (Haga *et al.*, 1977; Yeager *et al.*, 1985; Tang *et al.*, 1995). Is it possible that such oligomeric complexes could also be formed in *M. tuberculosis*-infected cells between Rv1625c and an AC pseudoheterodimer of the host? Of course this would require direct membrane interactions between host and pathogen beyond those during phagocytosis. It has been demonstrated that living mycobacteria affect the protein composition of phagosomal membranes (Ferrari *et al.*, 1999) and that mycobacterial lipids and proteins are released from the phagosome (Beatty and Russell, 2000; Beatty *et al.*, 2000).

#### Is cAMP involved in pathogenesis?

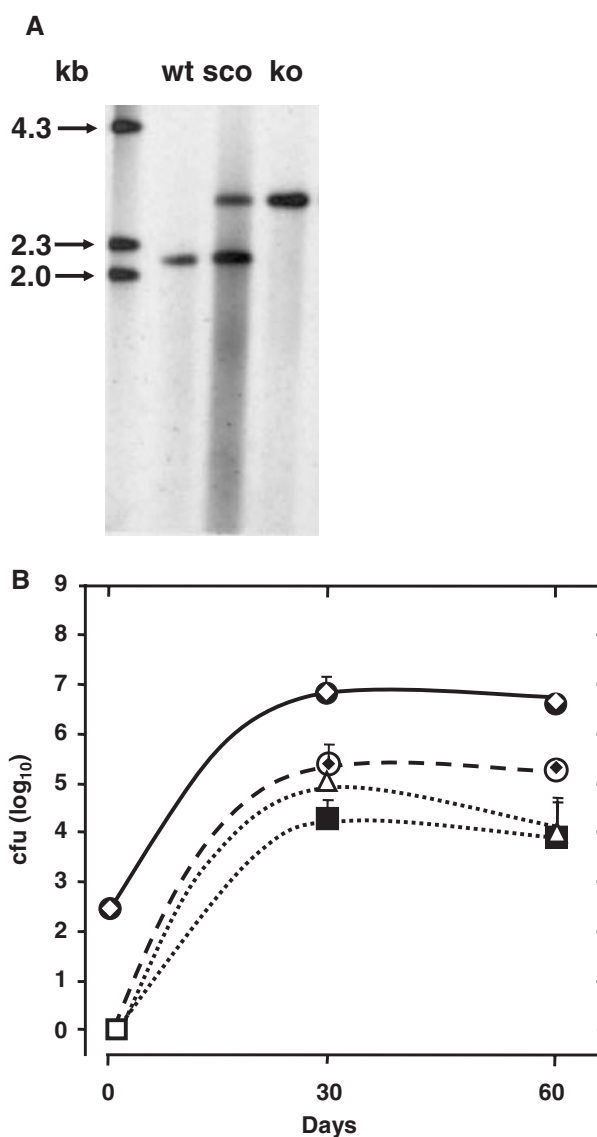
The genomic sequence of *Mycobacterium bovis*, the progenitor strain of the BCG strain, is almost identical (> 99.95%) to that of *M. tuberculosis* H37Rv and gene Mb1651c codes for a 418-amino-acid protein identical to AC Rv1625c from *M. tuberculosis* but for an N-terminal deletion of 25 aa (Garnier *et al.*, 2003). Therefore, we determined AC activity and cAMP levels in the culture medium of *M. bovis* BCG. Using an affinity-purified antibody against the catalytic domain of AC Rv1625c we identified a distinct 45 kDa band in the membrane fraction which was absent in the cytosol (data not shown), i.e. the Rv1625c congener was expressed in *M. bovis* BCG culture. While AC activity was not detectable in the culture medium, it contained 38 pmol  $ml^{-1}$  cAMP during logarithmic growth and 96 pmol  $ml^{-1}$  in stationary phase. Provided such a cAMP secretion occurs after phagocytosis of mycobacteria by macrophages this may contribute to the arrest of phagosome maturation as suggested recently as a virulence mechanism of *M. tuberculosis* (Russell, 2003). The data are also consistent with a report that macrophages infected with living mycobacteria have elevated levels of cAMP (Lowrie *et al.*, 1975). We are aware, that

in view of 15 AC genes in the pathogen it is currently impossible to pinpoint the intracellular generator of the secreted cAMP.

In *M. tuberculosis* 15 genes code for ACs of different domain composition and 10 expressed proteins have been shown to possess cyclase activity (Cole *et al.*, 1998; McCue *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2001; Linder *et al.*, 2002; 2004b; Linder and Schultz, 2003; Shenoy *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2005; Sinha *et al.*, 2005; A. Motaal unpublished data). While none of them can be excluded as a potential virulence factor, it is self-evident that this has to be evaluated step by step. Here we examined AC Rv1625c. We generated a  $\Delta$ Rv1625c mutant of the virulent *M. tuberculosis* H37Rv strain by allelic replacement, termed *M. tuberculosis*  $\Delta$ Rv1625c, by transformation with the suicide plasmid p $\Delta$ Rv1625c::aph-rpsL using the *rpsL* counterselection strategy (Sander *et al.*, 2001). Deletion of Rv1625c was verified by Southern blot analysis. A 2.1 kb NcoI fragment from the parental DNA hybridized to a corresponding probe whereas in the mutant strain the NcoI fragment was 2.7 kb due to substitution of a 622 bp fragment of the Rv1625c gene by a 1.2 kb kanamycin resistance cassette (Fig. 6A).

The *in vitro* growth of *M. tuberculosis*  $\Delta$ Rv1625c in Middlebrook 7H9-OADC-Tween broth or on Middlebrook 7H10 agar plates was indistinguishable from the parental strain. Next, an established aerosol infection model of the mouse which is regarded to closely mimic the mode of infection in humans, i.e. inhalation of droplet nuclei (North, 1995), was used to examine the virulence of *M. tuberculosis*  $\Delta$ Rv1625c. In this model, the bacteria are seeded into the lung and multiply extensively during an initial acute phase of infection. Subsequently, bacteria spread from the primary site of infection to other organs. The onset of a cellular immune response after 3–4 weeks results in partial control of mycobacterial multiplication and a chronic and largely constant bacterial load.

Two groups of C57BL/6 mice (20 animals per group) were infected via the aerosol route with 100–1000 colony-forming units (cfu) of *M. tuberculosis* H37Rv and the  $\Delta$ Rv1625c mutant. The murine organs exhibited the characteristic course of mycobacterial growth and after 4 weeks a constant bacterial load was reached (Fig. 6B). Both mycobacterial strains, wild-type and  $\Delta$ Rv1625c mutant, spread to other organs such as spleen and liver identically (Fig. 6B). Mice succumbed to infection about 250 days after infection irrespective of the Rv1625c genotype. Similarly, granuloma formation in the lungs was indistinguishable in response to *M. tuberculosis*  $\Delta$ Rv1625c and the wild-type strain (data not shown). In summary, the *M. tuberculosis*  $\Delta$ Rv1625c mutant did not exhibit signs of attenuation, neither with respect to number of colony-forming units in different organs, dissemination, lung pathology nor time to death.



**Fig. 6.** Genotypic and phenotypic characterization of *M. tuberculosis* Rv1625c mutant.

A. Genomic DNA of *M. tuberculosis* wild-type (wt), a single cross-over intermediate strain (sco) and a  $\Delta$ Rv1625c knockout mutant (ko) was digested with NcoI and probed with a 2.1 kb NcoI probe. The 2.1 kb probe hybridizes to a single corresponding fragment in the wild-type strain and to a single 2.7 kb fragment in the  $\Delta$ Rv1625c strain. The sco intermediate strain is characterized by the presence of both a functional Rv1625c gene (2.1 kb) and an inactivated copy (2.7 kb). Inactivation of Rv1625c in strain  $\Delta$ Rv1625c is indicated by the increased size of the hybridizing fragment due to substitution of an Rv1625c fragment (622 bp) by a 1.2 kb kanamycin resistance cassette.

B. Bacterial growth in lung (wild type: ●;  $\Delta$ Rv1625c: ◇), liver (wild type: ○;  $\Delta$ Rv1625c: ◆) and spleen (wild type: △;  $\Delta$ Rv1625c: ■) of C57BL/6 mice following *M. tuberculosis* wild type and  $\Delta$ Rv1625c mutant strain aerosol infection. Colony-forming unit counts of *M. tuberculosis* were determined at the indicated time points. Data represent means  $\pm$  SD of five mice per group. Another independent experiment was carried out with identical results.



## Discussion

Although the sequence of a mammalian AC was reported 15 years ago (Krupinski *et al.*, 1989), we know little about the function of the two large membrane domains. Using the homodimeric mycobacterial AC Rv1625c as a model for pseudoheterodimeric mammalian ACs we demonstrate that one essential role of the membrane domains is dimerization. Its efficiency is such that Rv1625c monomers are virtually non-existent. Accordingly, in gel-filtration experiments monomers of Rv1625c were absent (data not shown). The strong propensity of AC Rv1625c monomers to dimerize is functionally almost tantamount to the covalent linkage in mammalian pseudoheterodimers. This explains why an exchange of monomers between disparate dimers was very slow, e.g. between Rv1625c-R376A and Rv1625c-D300A dimers.

The evolution of two linked monomers with subsequent development of peculiar regulatory properties in mammalian ACs provokes the question: how the AC Rv1625c is regulated in *M. tuberculosis*? Although the catalytic fold of AC Rv1625c appears similar to that of mammalian ACs, the mammalian activators forskolin,  $G_{\text{sx}}$  or calmodulin have little effect (Reddy *et al.*, 2001). Possibly AC Rv1625c is subject to bacterial regulatory factors which may mechanistically act similar to those in mammals or the activity of AC Rv1625c is regulated via its membrane domain in a receptor-effector type setting. For example, the membrane lipids or lipids of the complex mycobacterial cell envelope may affect or even guide dimerization and thus formation of the active centre.

The evolutionary relatedness of the monomeric AC Rv1625c to its pseudoheterodimeric mammalian congeners was most evident by the successful generation of a mammalian-type AC analogue by simply linking two monomers in a head-to-tail fashion. In this construct the equivalent of a mammalian C1b region of 67 aa was generated from the C-terminal of monomer 1 and the N-terminal of monomer 2. This C1b equivalent had no resemblance to a C1b region of 96–140 amino acids present in the nine mammalian ACs. In mammalian ACs, the MI and MII domains are used in a pair-like, isoform delimited manner, and their sequential order must be maintained to enable formation of the active cleft (Seebacher *et al.*, 2001; Gu *et al.*, 2002). Therefore, it was unexpected that we could replace the second mycobacterial membrane domain in (Rv1625c)<sub>2</sub> with either MI or MII from ACV as in Rv1625c-(MI)-Rv1625c and Rv1625c-(MII)-Rv1625c. Obviously, the mycobacterial membrane anchor is promiscuous when it comes to compatibility with other AC membrane domains and a considerable flexibility seems to prevail for the co-ordinate formation of the catalytic fold. In this context it is noteworthy that Rv1625c is expressed as an active AC in mammalian HEK293 cells

(Guo *et al.*, 2001), i.e. the mycobacterial membrane anchor is not only functionally compatible with those from mammalian ACs but also operates equally well in mammalian as well as in bacterial cell membranes irrespective of different lipid compositions. The structural similarities between the mycobacterial AC Rv1625c and mammalian ACs raised the question whether AC Rv1625c may be involved in pathogenesis.

In both, eukaryotes and prokaryotes cAMP levels usually are tightly controlled. In eukaryotic cells, cAMP formation is regulated by hormonal networks operating from the outside and intracellular cAMP affects processes ranging from responsiveness and sensitivity to extracellular hormones, energy metabolism, secretion, ion and water fluxes, and proliferation to control of inflammatory responses (Torgersen *et al.*, 2002). In contrast, in prokaryotic cells cAMP formation appears to be controlled by environmental cues and it exerts biological activity mainly at the level of bacterial transcription. This way, cAMP levels affect processes such as carbon utilization, osmoregulation, chemotaxis, phototaxis, pH-regulation, sporulation and virulence (Linder and Schultz, 2003; Baker and Kelly, 2004). *M. tuberculosis* belongs to the order *Actinomycetales*. In bacteria of this order cAMP has been shown to be involved in sporulation, response to pH and carbon utilization as in *Streptomyces* (Susstrunk *et al.*, 1998) or regulation of the glyoxylate bypass as in *Corynebacterium* (Kim *et al.*, 2004). The latter pathway appears to be of considerable importance for the persistence of an *M. tuberculosis* infection (McKinney *et al.*, 2000).

When it comes to invasion of a host cell instances are known in which bacteria use the cAMP signalling system for survival and to evade the defences of the host. Most prominent examples are the exotoxins from *Bordetella pertussis* (CyaA) and *Bacillus anthracis* (edema factor) which as class II ACs are major virulence factors. Bacterial class III ACs are discussed as a conserved mechanism for bacterial sensing of nutrients or the presence of host tissues. Increased cAMP levels have been found in eukaryotic cells upon infection with a variety of intracellular pathogens (for review, see Gross *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2004). *M. tuberculosis* persists intracellularly for extended periods of time and multiplies in phagosomes by inhibiting maturation into phagolysosomes (Russell, 2003). Several lines of evidence suggest that cAMP may play an important role in pathophysiology. (i) Compared with other pathogens, *M. tuberculosis* contains the remarkable number of 15 annotated ACs, many of which are highly active (McCue *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2001; Linder *et al.*, 2002; 2004b; Shenoy *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2005; Sinha *et al.*, 2005; A. Motaal unpublished data). (ii) The modular composition of the mycobacterial ACs indicates that they are regulated by different external conditions (Linder and Schultz, 2003). (iii) Bacterial poly-

morphisms in AC genes are associated with different abilities to induce immunoreactivity (Fleischmann *et al.*, 2002). (iv) Differences at the transcriptional level of individual AC genes have been demonstrated between *M. tuberculosis* H37Rv and its attenuated derivative *M. tuberculosis* H37Ra (Rindi *et al.*, 2001). (v) An increase of intracellular cAMP levels upon infection of macrophages with live but not with killed mycobacteria was demonstrated generating the hypothesis that cAMP inhibits phagosome maturation (Lowrie *et al.*, 1975; 1979). In fact, transcriptome and proteome analysis of *M. tuberculosis* grown under a variety of *in vitro* conditions (nutrient-starvation, hypoxia, acidic stress and antibiotic treatment) did not reveal transcriptional alteration of Rv1625c (Betts *et al.*, 2002; Fisher *et al.*, 2002; Boshoff *et al.*, 2004; Mutucumura *et al.*, 2004; Beste *et al.*, 2005) suggesting that Rv1625c is constitutively expressed. However, minor alterations in the stability and activity of the enzyme may have profound consequences for the cAMP level.

To investigate the potential role of ACs in *M. tuberculosis* pathogenesis we started to engineer *M. tuberculosis* knockout mutants deficient in individual AC genes. The  $\Delta$ Rv1625c mutant showed wild-type growth characteristics *in vitro*. As virulence associated parameters in a mouse infection model we investigated the number of colony forming units in lung, liver and spleen, organ pathology and time to death. None of these investigations revealed a virulence attenuation of this mutant. This indicated that AC Rv1625c alone is not a virulence factor. However, this may not exclude a role of AC Rv1625c during a given stage of infection, such as latency, or infection of a particular organ or tissue. One possibility is that one or several of the other 14 mycobacterial ACs may compensate for the loss of AC Rv1625c. Another point of view is that AC Rv1625c is not essential individually but is cardinal in conjunction with another gene product. Work in progress addresses the AC redundancy in *M. tuberculosis* by generating further single and multiple knockout mutants.

## Experimental procedures

### Recombinant cDNAs

Gene Rv1625c was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using specific primers and genomic DNA as a template. The DNA fragment was inserted either into pQE30 (Qiagen) by 5' BamHI and 3' ScaI sites with the N-terminal addition of a MRGSH<sub>6</sub>GS peptide or into pQE60 by 5' NcoI and 3' BglII sites as described (Guo *et al.*, 2001). The pQE60 has a C-terminal His<sub>6</sub>-tag. Mutations were introduced by site-directed mutagenesis using respective PCR primers and the DNA coding for the holoenzyme Rv1625c as a template. Two Rv1625c were linked (C- to N-terminus) by conventional molecular biology techniques, generating Rv1625c<sub>1-443</sub>Rv1625c<sub>1-443</sub>-RSH<sub>6</sub> in pQE60, abbreviated as (Rv1625c)<sub>2</sub>.

The membrane domain in Rv1625c (residues 47–203) was replaced by MI (residues 245–398) or MII (residues 768–1008) of rabbit type V AC using a 5' BstAPI or an introduced MluI site and a 3' XhoI restriction site in Rv1625c and correspondingly designed PCR products for MI (with 5' BstAPI and 3' XhoI) and MII (with 5' MluI and 3' XhoI) thus generating (MI)-Rv1625c and (MII)-Rv1625c.

Rv1625c and (MI)-Rv1625c [or (MII)-Rv1625c] were joined together (C- to N-terminus) using a BglII site at the C-terminal of Rv1625c and a BamHI site at the N-terminus of (MI)-Rv1625c [or (MII)-Rv1625c] yielding Rv1625c-(MI)-Rv1625c and Rv1625c-(MII)-Rv1625c respectively. Similarly, Rv1625c-D300A-(MI)-Rv1625c-R376A and Rv1625c-D300A-(MII)-Rv1625c-R376A were obtained from respective building blocks. All constructs with an Rv1625c topology were in pQE30 with N-terminal His<sub>6</sub>-tag, and constructs with a mammalian AC topology were processed in pQE60 with a C-terminal his-tag. The fidelity of all constructs was verified by sequencing. The sequences of all primers are available on request.

### Expression and purification of proteins

Proteins were expressed in either *E. coli* BL21(DE3) [pRep4] or the *E. coli* cya<sup>-</sup> strain DHP1[pRep4] at 22°C for 3 h in the presence of 100 mg l<sup>-1</sup> ampicillin and 25 mg l<sup>-1</sup> kanamycin using 30 µM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside as an inducer added at an A<sub>600</sub> of 0.4. Harvested cells were washed with 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8 and stored at -80°C. After suspension in 50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10 mM β-mercaptoethanol, pH 8 containing the complete protease inhibitor cocktail (Roche Molecular) bacteria were passed through a French press at 18 000 psi. Cell debris was removed (3000 g, 30 min) and membranes were collected by centrifugation at 100 000 g for 1 h. Cell membranes were suspended in 50 mM Tris-HCl, 15 mM β-mercaptoethanol, 250 mM NaCl and 20% glycerol (pH 8) and treated with 1% polydocanol or 0.6% n-dodecyl-β-D-maltoside for 1 h at 0°C. After centrifugation (100 000 g, 1 h) proteins were purified by Ni-NTA affinity chromatography (Qiagen). Samples were allowed to bind overnight at 0°C. The resin was poured into a column, washed with 1.5 ml of wash buffer A (50 mM Hepes, 10 mM β-mercaptoethanol, 400 mM NaCl, 5 mM imidazole and 20% glycerol, pH 7.5), 1.5 ml of wash buffer B (buffer A +15 mM imidazole) and 1.5 ml of wash buffer C (buffer A +10 mM NaCl and 15 mM imidazole). Proteins were eluted with 0.3 ml of buffer C containing 300 mM imidazole. The eluate was dialysed for 3 h against 50 mM Hepes, 10 mM β-mercaptoethanol, 10 mM NaCl and 20% glycerol, pH 7.5. After flash-freezing at -196°C proteins were stored at -80°C.

### Adenylyl cyclase assay

Cyclase activity was measured for 10 min in a volume of 100 µl (Salomon *et al.*, 1974). The reactions contained 22% glycerol, 50 mM Tris-HCl, 2 mM MnCl<sub>2</sub>, pH 7.5, 75 or 850 µM ATP (25 kBq [α-<sup>32</sup>P]-ATP) and 2 mM cAMP (150 Bq [2, 8-<sup>3</sup>H]-cAMP). For determination of kinetic constants, ATP was varied from 3 µM to 100 µM with 2 mM Mn<sup>2+</sup> and from 0.1 to

1 mM with 20 mM Mg<sup>2+</sup>. Substrate conversion was kept below 10% throughout.

### Western blot analysis

After separation by SDS-PAGE (12.5 or 15%) proteins were blotted onto PVDF membrane, probed with an affinity-purified antibody specific for AC Rv1625c<sub>204-443</sub>. After incubation with a 1:5000 dilution of a peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG as a secondary antibody (Dianova) detection was carried out with the ECL Plus kit (Amersham-Pharmacia).

*Mycobacterium bovis* BCG cultures (50 ml) were harvested by centrifugation, flash frozen in liquid nitrogen, suspended in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, and broken by passing through a French press. After centrifugation (40 000 g, 30 min) the pellet was used to examine AC activity and the presence of Mb1651c AC by Western blotting using the antibody against AC Rv1625c<sub>204-443</sub>.

### Cross-linking with glutaraldehyde

Cross-linking was carried out in 15 µl of 50 mM phosphate buffer containing 10 mM NaCl, 14 mM glutaraldehyde and 20% glycerol, pH 7.5, at 22°C. Reactions were quenched with 4 µl of sample buffer; proteins were resolved by 12.5% SDS-PAGE and detected by Western blotting using the antibody described above.

### Mycobacterial strains and growth

*Mycobacterium tuberculosis* was grown on Middlebrook 7H10 agar supplemented with 10% oleic acid, albumin, dextrose and catalase (OADC, Difco). Tween 80 was added to liquid broth 7H9-OADC to avoid clumping; when appropriate, antibiotics were added at the following concentrations: kanamycin 50 µg ml<sup>-1</sup>; streptomycin 100 µg ml<sup>-1</sup>. Strain designations were *M. tuberculosis* H37Rv #1424, a derivative of *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC) (Sander *et al.*, 2004); *M. tuberculosis* ΔRv1625c, an Rv1625c deletion mutant.

For mouse infections, mycobacteria were grown in Middlebrook 7H9 broth (Difco, Detroit, MI) supplemented with Middlebrook oleic acid, albumin dextrose and catalase enrichment medium (Life Technologies, Gaithersburg, MD), 0.002% glycerol and 0.05% Tween 80. Midlog cultures were harvested and frozen at -80°C. After thawing, viable cell counts were determined by plating serial dilutions of the cultures on Middlebrook 7H10 agar plates followed by incubation at 37°C.

### Deletion of Rv1625c in *M. tuberculosis* H37Rv

*Mycobacterium tuberculosis* Rv1625c (open reading frame: 1826614[stop]-1827945[start], <http://genolist.pasteur.fr/Tuberculist/>) and its flanking region were isolated from an *M. tuberculosis* BAC clone library (Brosch *et al.*, 1998). Briefly, BAC clone 417 was digested with Scal and HindIII and the resulting 4724 bp fragment comprising Rv1625c was inserted into pBluescript-rpsL (Sander *et al.*, 2001) previously digested with EcoRV and HindIII, generating

pRv1625c-rpsL. A 622 bp Esp3I fragment of Rv1625c was replaced by the 1.2 kb kanamycin resistance cassette from pUC4K (Pharmacia). The resulting suicide plasmid pΔRv1625c::aph-rpsL was transformed by electroporation into streptomycin-resistant strain 1424 of *M. tuberculosis* H37Rv. Primary selection was performed in the presence of 50 µg ml<sup>-1</sup> kanamycin. Single cross-over transformants were identified by Southern blot analysis. These intermediate strains were subjected to counterselection in the presence of 50 µg of kanamycin and 100 µg of streptomycin ml<sup>-1</sup>. *M. tuberculosis* ΔRv1625c mutants were identified by Southern blot analysis using chromosomal DNA isolated from transformants, digested with NcoI and transferred to a Nylon+ membrane by vacuum blotting. Hybridization was with a 2.1 kb NcoI probe containing Rv1625c and its flanking region (H37Rv co-ordinates 1826565-1828722; Fig. 6A). Additionally, the membrane was stripped and probed with the 622 bp Esp3I deletion fragment and the kanamycin resistance cassette (see *Supplementary material*).

### Animal infection

Female, 6- to 8-week-old SPF C57BL/6 mice were maintained under biosafety level III conditions in 'individually ventilated cages' (IVC, Ebeco, Castrop-Rauxel, Germany).

Mycobacterial aliquots were diluted to achieve the deposition of approximately 100-1000 cfu in the lungs. Mice were aerogenically infected with each of the *M. tuberculosis* strains for 40 min in the exposure chamber of an aerosol infection device (Glas-Col, Terre-Haute, IN). The inoculum was confirmed by determination of *M. tuberculosis* cfu counts in the lungs of three mice per strain 1 day after infection. Mice were sacrificed according to ethical guidelines at each point in time (four to five mice per point), organs were removed, weighed and homogenized. Tenfold serial dilutions were plated on 7H10 agar and results are expressed as means cfu ± SD. Five mice per strain were monitored for survival. Animal experiments were approved by the respective authority.

### Acknowledgements

We thank Erik C. Böttger for continuous support and S.T. Cole for providing the BAC library. This work was supported by the Swiss National Science Foundation (3200-068488) to P.S. and Eric C. Böttger and the Deutsche Forschungsgemeinschaft.

### References

- Baker, D.A., and Kelly, J.M. (2004) Structure, function and evolution of microbial adenylyl and guanylyl cyclases. *Mol Microbiol* **52**: 1229-1242.
- Barzu, O., and Danchin, A. (1994) Adenylyl cyclases: a heterogeneous class of ATP-utilizing enzymes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **49**: 241-283.
- Beatty, W.L., and Russell, D.G. (2000) Identification of mycobacterial surface proteins released into subcellular compartments of infected macrophages. *Infect Immun* **68**: 6997-7002.



- Beatty, W.L., Rhoades, E.R., Ullrich, H.J., Chatterjee, D., Heuser, J.E., and Russell, D.G. (2000) Trafficking and release of mycobacterial lipids from infected macrophages. *Traffic* **1**: 235–247.
- Beste, D.J., Peters, J., Hooper, T., Avignone-Rossa, C., Bushell, M.E., and McFadden, J. (2005) Compiling a molecular inventory for *Mycobacterium bovis* BCG at two growth rates: evidence for growth rate-mediated regulation of ribosome biosynthesis and lipid metabolism. *J Bacteriol* **187**: 1677–1684.
- Betts, J.C., Lukey, P.T., Robb, L.C., McAdam, R.A., and Duncan, K. (2002) Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Mol Microbiol* **43**: 717–731.
- Boshoff, H.I., Myers, T.G., Copp, B.R., McNeil, M.R., Wilson, M.A., Barry, C.E., 3rd (2004) The transcriptional responses of *Mycobacterium tuberculosis* to inhibitors of metabolism: novel insights into drug mechanisms of action. *J Biol Chem* **279**: 40174–40184.
- Brosch, R., Gordon, S.V., Billault, A., Garnier, T., Eiglmeier, K., Soravito, C., et al. (1998) Use of a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv bacterial artificial chromosome library for genome mapping, sequencing, and comparative genomics. *Infect Immun* **66**: 2221–2229.
- Castro, L., Hermsen, C., Schulz, J.E., and Linder, J.U. (2005) Adenyl cyclase Rv0386 from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv uses a novel mode for substrate selection. *FEBS J.* (in press).
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., et al. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**: 537–544.
- Cotta, M.A., Whitehead, T.R., and Wheeler, M.B. (1998) Identification of a novel adenylate cyclase in the ruminal anaerobe, *Prevotella ruminicola* D31d. *FEMS Microbiol Lett* **164**: 257–260.
- Ferrari, G., Langen, H., Naito, M., and Pieters, J. (1999) A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell* **97**: 435–447.
- Fisher, M.A., Plikaytis, B.B., and Shinnick, T.M. (2002) Microarray analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* transcriptional response to the acidic conditions found in phagosomes. *J Bacteriol* **184**: 4025–4032.
- Fleischmann, R.D., Alland, D., Eisen, J.A., Carpenter, L., White, O., Peterson, J., et al. (2002) Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J Bacteriol* **184**: 5479–5490.
- Garnier, T., Eiglmeier, K., Camus, J.C., Medina, N., Mansoor, H., Pryor, M., et al. (2003) The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 7877–7882.
- Gross, A., Bouaboula, M., Casellas, P., Liautard, J.P., and Dornand, J. (2003) Subversion and utilization of the host cell cyclic adenosine 5'-monophosphate/protein kinase A pathway by *Brucella* during macrophage infection. *J Immunol* **170**: 5607–5614.
- Gu, C., Cali, J.J., and Cooper, D.M. (2002) Dimerization of mammalian adenylate cyclases. *Eur J Biochem* **269**: 413–421.
- Guo, Y.L., Seebacher, T., Kurz, U., Linder, J.U., and Schultz, J.E. (2001) Adenyl cyclase Rv1625c of *Mycobacterium tuberculosis*: a progenitor of mammalian adenyl cyclases. *EMBO J* **20**: 3667–3675.
- Haga, T., Haga, K., and Gilman, A.G. (1977) Hydrodynamic properties of the beta-adrenergic receptor and adenylate cyclase from wild type and variant S49 lymphoma cells. *J Biol Chem* **252**: 5776–5782.
- Kim, H.J., Kim, T.H., Kim, Y., and Lee, H.S. (2004) Identification and characterization of *glxR*, a gene involved in regulation of glyoxylate bypass in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **186**: 3453–3460.
- Krupinski, J., Coussen, F., Bakalyar, H.A., Tang, W.J., Feinstein, P.G., Orth, K., et al. (1989) Adenyl cyclase amino acid sequence: possible channel- or transporter-like structure. *Science* **244**: 1558–1564.
- Linder, J.U., and Schultz, J.E. (2003) The class III adenyl cyclases: multi-purpose signalling modules. *Cell Signal* **15**: 1081–1089.
- Linder, J.U., Schultz, A., and Schultz, J.E. (2002) Adenyl cyclase Rv1264 from *Mycobacterium tuberculosis* has an autoinhibitory N-terminal domain. *J Biol Chem* **277**: 15271–15276.
- Linder, J.U., Castro, L.I., Guo, Y.L., and Schultz, J.E. (2004a) Functional chimeras between the catalytic domains of the mycobacterial adenyl cyclase Rv1625c and a Paramoecium guanylyl cyclase. *FEBS Lett* **568**: 151–154.
- Linder, J.U., Hammer, A., and Schultz, J.E. (2004b) The effect of HAMP domains on class IIIb adenyl cyclases from *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Biochem* **271**: 2446–2451.
- Lowrie, D.B., Jaccott, P.S., and Ratcliffe, N.A. (1975) *Mycobacterium microti* may protect itself from intracellular destruction by releasing cyclic AMP into phagosomes. *Nature* **254**: 600–602.
- Lowrie, D.B., Aber, V.R., and Jaccott, P.S. (1979) Phagosome-lysosome fusion and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate in macrophages infected with *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium bovis* BCG or *Mycobacterium lepraemurium*. *J Gen Microbiol* **110**: 431–441.
- McCue, L.A., McDonough, K.A., and Lawrence, C.E. (2000) Functional classification of cNMP-binding proteins and nucleotide cyclases with implications for novel regulatory pathways in *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res* **10**: 204–219.
- McKinney, J.D., Honer zu Bentrup, K., Munoz-Elias, E.J., Miczak, A., Chen, B., Chan, W.T., et al. (2000) Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* **406**: 735–738.
- Muttucumura, D.G., Roberts, G., Hinds, J., Stabler, R.A., and Parish, T. (2004) Gene expression profile of *Mycobacterium tuberculosis* in a non-replicating state. *Tuberculosis* **84**: 239–246.
- North, R.J. (1995) *Mycobacterium tuberculosis* is strikingly more virulent for mice when given via the respiratory than via the intravenous route. *J Infect Dis* **172**: 1550–1553.
- Reddy, S.K., Kamireddi, M., Dhanireddy, K., Young, L., Davis, A., and Reddy, P.T. (2001) Eukaryotic-like adenyl cyclases in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: cloning and characterization. *J Biol Chem* **276**: 35141–35149.
- Rindi, L., Lari, N., and Garzelli, C. (2001) Genes of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv downregulated in the attenu-



- ated strain H37Ra are restricted to *M. tuberculosis* complex species. *New Microbiol* **24**: 289–294.
- Russell, D.G. (2003) Phagosomes, fatty acids and tuberculosis. *Nat Cell Biol* **5**: 776–778.
- Salomon, Y., Londres, C., and Rodbell, M. (1974) A highly sensitive adenylyl cyclase assay. *Anal Biochem* **58**: 541–548.
- Sander, P., Springer, B., and Boettger, E.C. (2001) *Gene Replacement in Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis BCG Using rpsL+ as a Dominant Negative Selectable Marker: Methods in Molecular Medicine*. Totowa, NJ: Humana Press.
- Sander, P., Rezwani, M., Walker, B., Rampini, S.K., Kroppenstedt, R.M., Ehlers, S., et al. (2004) Lipoprotein processing is required for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **52**: 1543–1552.
- Seebacher, T., Linder, J.U., and Schultz, J.E. (2001) An isoform-specific interaction of the membrane anchors affects mammalian adenylyl cyclase type V activity. *Eur J Biochem* **268**: 105–110.
- Shenoy, A.R., Sreenath, N.P., Mahalingam, M., and Visweswariah, S.S. (2004) Characterization of phylogenetically distant members of the adenylyl cyclase family from mycobacteria: Rv1647 from *M. tuberculosis* and its ortholog ML1399 from *M. leprae*. *Biochem J* **387**: 541–557.
- Sinha, S.C., Wetterer, M., Sprang, S.R., Schultz, J.E., and Linder, J.U. (2005) Origin of asymmetry in adenylyl cyclases: structures of *Mycobacterium tuberculosis* Rv1900c. *EMBO J* **24**: 663–673.
- Sismeiro, O., Trotot, P., Biville, F., Vivares, C., and Danchin, A. (1998) *Aeromonas hydrophila* adenylyl cyclase 2: a new class of adenylyl cyclases with thermophilic properties and sequence similarities to proteins from hyperthermophilic archaeobacteria. *J Bacteriol* **180**: 3339–3344.
- Smith, R.S., Wolfgang, M.C., and Lory, S. (2004) An adenylyl cyclase-controlled signaling network regulates *Pseudomonas aeruginosa* virulence in a mouse model of acute pneumonia. *Infect Immun* **72**: 1677–1684.
- Steebhorn, C., Litvin, T.N., Levin, L.R., Buck, J., and Wu, H. (2005) Bicarbonate activation of adenylyl cyclase via promotion of catalytic active site closure and metal recruitment. *Nat Struct Mol Biol* **12**: 32–37.
- Susstrunk, U., Pidoux, J., Taubert, S., Ullmann, A., and Thompson, C.J. (1998) Pleiotropic effects of cAMP on germination, antibiotic biosynthesis and morphological development in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **30**: 33–46.
- Tang, W.J., Stanzel, M., and Gilman, A.G. (1995) Truncation and alanine-scanning mutants of type I adenylyl cyclase. *Biochemistry* **34**: 14563–14572.
- Tellez-Sosa, J., Soberon, N., Vega-Segura, A., Torres-Marquez, M.E., and Cevallos, M.A. (2002) The *Rhizobium etli* cyaC product: characterization of a novel adenylyl cyclase class. *J Bacteriol* **184**: 3560–3568.
- Tesmer, J.J., Sunahara, R.K., Gilman, A.G., and Sprang, S.R. (1997) Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with Gsa-GTPγS. *Science* **278**: 1907–1916.
- Torgersen, K.M., Vang, T., Abrahamsen, H., Yaqub, S., and Tasken, K. (2002) Molecular mechanisms for protein kinase A-mediated modulation of immune function. *Cell Signal* **14**: 1–9.
- Yeager, R.E., Heideman, W., Rosenberg, G.B., and Storm, D.R. (1985) Purification of the calmodulin-sensitive adenylyl cyclase from bovine cerebral cortex. *Biochemistry* **24**: 3776–3783.
- Zhang, G., Liu, Y., Ruoho, A.E., and Hurley, J.H. (1997) Structure of the adenylyl cyclase catalytic core. *Nature* **386**: 247–253.

SHORT COMMUNICATION

## Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* mutant deficient in pH-sensing adenylate cyclase Rv1264

Dorothea Dittrich<sup>a</sup>, Christine Keller<sup>b</sup>, Stefan Ehlers<sup>b</sup>, Joachim E. Schultz<sup>c</sup>, Peter Sander<sup>a,d,\*</sup>

<sup>a</sup>Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universität Zürich, Gloriastrasse 30/32, CH-8006 Zürich, Switzerland

<sup>b</sup>Molecular Infection Biology, Research Center Borstel, Parkallee 22, D-23845 Borstel, Germany

<sup>c</sup>Abteilung Pharmazeutische Biochemie, Pharmazeutisches Institut, Universität Tübingen, Morgenstelle 8, D-72076 Tübingen, Germany

<sup>d</sup>Nationales Referenz Zentrum für Mykobakterien, Gloriastrasse 30, CH-8006 Zürich, Switzerland

Received 12 May 2006; received in revised form 30 June 2006; accepted 13 July 2006

### Abstract

*Mycobacterium tuberculosis* open reading frame Rv1264 encodes an adenylate cyclase that exhibits its highest enzymatic activity at an acidic pH of 6.0. This is the pH *M. tuberculosis* encounters in the phagosome. Consequently Rv1264 has been suggested to sense the phagosomal milieu resulting in adaption of *M. tuberculosis* to its intracellular niche. A targeted knock-out mutant deficient in Rv1264, however, exhibits wild-type virulence.

© 2006 Elsevier GmbH. All rights reserved.

**Keywords:** *M. tuberculosis*; Adenylate cyclase; Rv1264; Phagosome acidification

### Introduction

*Mycobacterium tuberculosis*, the causative agent of tuberculosis, is a major threat to public health (Dye et al., 1999). Sequence determination of the *M. tuberculosis* genome provided a genetic blueprint of this devastating bacterial pathogen but also revealed the absence of classical virulence factors (Cole et al., 1998).

*M. tuberculosis* is an intracellular pathogen that resides in the phagosome of macrophages and prevents its normal maturation (Armstrong and Hart, 1971; Russell, 2001). Phagosomes containing viable mycobacteria are characterized by the absence of mature

lysosomal hydrolases and by incomplete luminal acidification due to the absence of the vATPase proton pump (Vergne et al., 2004). Adenylate cyclases (ACs) – enzymes synthesising cAMP from ATP – have been identified as virulence factors in a variety of bacterial pathogens, e.g. *Bacillus anthracis*, *Bordetella pertussis*, *Vibrio vulnificus* and *Yersinia enterocolitica*. In *B. anthracis* and *B. pertussis* ACs function as exotoxins (Linder and Schultz, 2003). In *V. vulnificus* cAMP plays an essential role in global regulation (Kim et al., 2005) and in *Y. enterocolitica* an adenylate cyclase is required for coordinated expression of virulence genes (Petersen and Young, 2002). The *M. tuberculosis* genome contains an impressive number of 15 putative class III adenylate cyclase genes (McCue et al., 2000). This large panel of ACs suggests that cAMP formation may contribute to the virulence of pathogenic mycobacteria either by interfering with the host signalling system or by

\*Corresponding author. Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universität Zürich, Gloriastrasse 30/32, CH-8006 Zürich, Switzerland. Tel.: +41 44 634 2684; fax: +41 44 634 4906.

E-mail address: [psander@immv.unizh.ch](mailto:psander@immv.unizh.ch) (P. Sander).

modulating bacterial gene expression. The hypothesis that cAMP affects the host signalling system is supported by the observation that cAMP levels are elevated in cultured macrophages which have ingested viable mycobacteria but not in those which have ingested dead bacteria (Lowrie et al., 1975). Recently, it was demonstrated that cAMP regulates gene expression in mycobacteria under low-oxygen conditions (Gazdik and McDonough, 2005) and a protein encoded by Rv3676 was identified as a cAMP receptor protein, which binds to specific DNA sequences in a cAMP-dependent manner (Bai et al., 2005).

The structure of the *M. tuberculosis* adenylate cyclase Rv1264 has been resolved recently. Rv1264 is a unique AC that exhibits its highest activity at a mildly acidic pH and thus qualifies as a candidate for sensing the acidity within a phagosome (Tews et al., 2005). Investigations in another genus of the order Actinomycetales, i.e. *Streptomyces*, corroborate a physiological role for a Rv1264 homologue (*cya*) in acidic stress response. When *S. coelicolor* is grown on glucose-containing medium, the medium becomes acidified. A *cya* mutant of *S. coelicolor* is unable to neutralize an acidic environment and stops growth as well as sporulation under these conditions (Susstrunk et al., 1998).

In order to test the hypothesis that Rv1264 senses the pH within the phagosome – a first step allowing *M. tuberculosis* to adapt to its intracellular niche – we constructed an *M. tuberculosis* mutant deficient in Rv1264. This mutant was characterized using virulence models of tuberculosis infection.

## Materials and methods

### Bacterial strains and growth conditions

*M. tuberculosis* was grown on Middlebrook 7H10 agar supplemented with 10% oleic acid, albumin, dextrose and catalase (OADC, Difco). Tween 80 (0.05%) was added to liquid broth 7H9-OADC to avoid clumping. For in vitro growth determination, bacteria were grown in 490-cm<sup>2</sup> polystyrene roller bottles (Corning) at 37°C and 2 rpm. Optical density readings were taken at 600 nm. When antibiotics were required they were added at the following concentration: kanamycin 50 µg/ml, streptomycin 100 µg/ml and hygromycin 50 µg/ml.

### Construction of mutant Rv1264

*M. tuberculosis* Rv1264 and its flanking regions [1409421–1416128 bp; <http://genolist.pasteur.fr/TubercuList>] were isolated from an *M. tuberculosis* BAC clone library (Brosch et al., 1998) and cloned into the HindIII

site of the pBluescript II SK vector, resulting in pBS-Rv1264. For functional inactivation an 887-bp SnaBI/Bsu36I [1412092–1412979 bp] fragment of Rv1264 was deleted and a hygromycin resistance cassette was inserted into the PmlI [1411906 bp] site. The Rv1264Δ::hyg allele was substituted for Rv1264 in *M. tuberculosis* H37Rv #1424 as described previously (Sander et al., 2001).

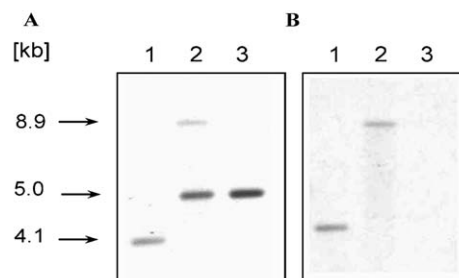
### Animal infection

Female, 6- to 8-week-old SPF C57BL/6 mice, maintained in “individually ventilated cages” (IVC, Ebeco, Castrop-Rauxel, Germany) under biosafety level III conditions, were aerogenically infected with 100 CFU of the *M. tuberculosis* strains. The inocula were confirmed by determination of CFU counts in the lungs 24 h after inoculation. At each time point chosen, i.e. 1, 30, 60 and 90 days following infection, serial dilutions of lung, spleen and liver homogenates (4–5 mice/timepoint) were plated on 7H10 agar containing 10% OADC and results were expressed as means CFU/organ ± SD.

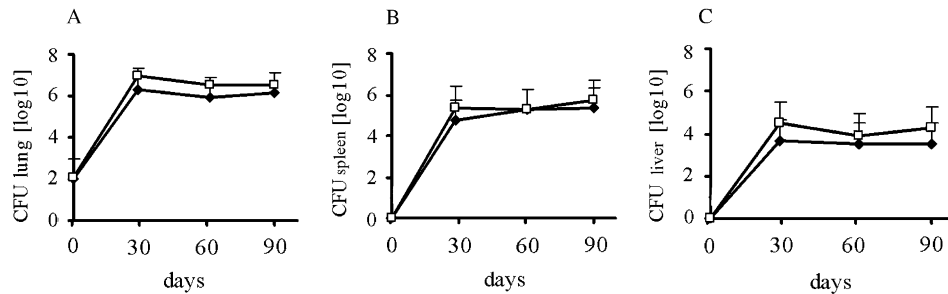
## Results and discussion

An *M. tuberculosis* Rv1264 mutant was generated by allelic replacement using the *rpsL* counterselection strategy (Sander et al., 2001) (Fig. 1).

To study in vitro growth, the *M. tuberculosis* parental strain and Rv1264Δ::hyg mutant strain were cultured in Middlebrook 7H9-OADC-Tween broth in roller bottles. The strains grew at similar rates, indicating that Rv1264 is not required for in vitro growth under these



**Fig. 1.** Southern blot analyses of genomic *M. tuberculosis* DNA (A, B). Southern blot analyses of chromosomal DNA from *M. tuberculosis* parental strain # 1424 (1), Rv1264 single cross over (2), Rv1264Δ::hyg (3) digested with Eco47III; hybridized with a Rv1264 5' probe (A) and a probe spanning the deletion region of Rv1264 (B). The shift of the 4.1-kb wild-type band to 5.0 kb and the presence of an additional 8.9-kb band indicate 3' homologous recombination of the targeting vector into the Rv1264 locus of the single cross-over mutant and subsequent intramolecular recombination resulting in deletion of Rv1264 in the Rv1264Δ::hyg knock-out mutant.



**Fig. 2.** Course of infection with *M. tuberculosis* (filled) and *Rv1264Δ::hyg* (open). Bacterial load in lung (A), spleen (B) and liver (C) of C57BL/6 mice following aerosol infection with approximately 100 CFU *M. tuberculosis* parental strain # 1424 and *Rv1264Δ::hyg* determined by CFU counts in organ homogenates.

conditions. Also on Middlebrook 7H10 agar plates, both growth and morphology of the *Rv1264Δ::hyg* knock-out mutant were indistinguishable from the parental strain.

To determine whether *Rv1264* functions as a virulence factor in mycobacteria, an in vivo infection experiment was carried out. In all mouse organs wild-type and mutant strain exhibited the characteristic course of mycobacterial growth. After an exponential phase of growth in the lung, a plateau of bacterial replication was reached at 4 weeks postinfection which persisted at the same level until day 90. Both, the wild-type and *Rv1264Δ::hyg* mutant spread to other organs (spleen, liver) with identical kinetics and magnitude (Fig. 2) and showed typical granulomatous infiltrations (data not shown). Identical results were obtained when using higher doses of *M. tuberculosis* wild-type strain and mutant strain for infection (data not shown). Based on these results, we concluded that deletion of *Rv1264* does not affect the course of infection, neither with respect to bacterial growth in different organs, dissemination, nor histopathology.

cAMP affects many important processes in bacteria such as osmoregulation, chemotaxis, phototaxis, pH-regulation, sporulation and virulence (Baker and Kelly, 2004; Kim et al., 2005; Kimura et al., 2005; Linder and Schultz, 2003). Several lines of evidence suggest that cAMP formation may play an important role in mycobacterial pathogenesis: (i) with 15 putative class III AC genes the genome of *M. tuberculosis* H37Rv contains a large number of cyclases (McCue et al., 2000) and the modular composition of the mycobacterial ACs suggests that they are regulated by different external stimuli (Linder and Schultz, 2003); (ii) elevated cAMP levels cause increased expression of at least 15 *M. tuberculosis* proteins under low-oxygen, CO<sub>2</sub>-enriched growth conditions (Gazdik and McDonough, 2005); (iii) inactivation of a cAMP receptor protein in *M. tuberculosis* (CRP<sub>Mt</sub>) results in virulence attenuation in vivo and reduced multiplication in mouse bone marrow-derived macrophages (Rickman et al., 2005); (iv) CRP<sub>Mt</sub>

interacts with cAMP and specific DNA-binding sites and the predicted CRP<sub>Mt</sub> regulon comprises ~114 genes (Bai et al., 2005). Together, these findings suggest an important role for cAMP-dependent signal transduction in global gene regulation in *M. tuberculosis*. Physiological investigations in a *Streptomyces cya* mutant (Susstrunk et al., 1998) and biochemical characteristics of the *Rv1264* AC enzyme (Linder et al., 2002) have suggested that the 15 ACs of *M. tuberculosis* *Rv1264* might be of prime importance for *M. tuberculosis* host–pathogen interaction. Our results indicate that the AC *Rv1264* is not a virulence factor per se and/or that one of the other 14 mycobacterial ACs may be capable to physiologically substitute the loss of *Rv1264* adenylyl cyclase activity. Work is in progress to address AC redundancy in *M. tuberculosis* by generating multiple knock-out mutants.

## Acknowledgements

We thank Erik C. Boettger for support and helpful discussion and S.T. Cole for providing the BAC library. This work was supported by the Swiss National Science Foundation (3200-068488) to P. Sander and E.C. Boettger and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (to J.E. Schultz).

## References

- Armstrong, J.A., Hart, P.D., 1971. Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. *J. Exp. Med.* 134, 713–740.
- Bai, G., McCue, L.A., McDonough, K.A., 2005. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Rv3676 (CRP<sub>Mt</sub>), a cyclic AMP receptor protein-like DNA binding protein. *J. Bacteriol.* 187, 7795–7804.
- Baker, D.A., Kelly, J.M., 2004. Structure, function and evolution of microbial adenylyl and guanylyl cyclases. *Mol. Microbiol.* 52, 1229–1242.

- Brosch, R., Gordon, S.V., Billault, A., Garnier, T., Eiglmeier, K., Soravito, C., Barrell, B.G., Cole, S.T., 1998. Use of a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv bacterial artificial chromosome library for genome mapping, sequencing, and comparative genomics. *Infect. Immun.* 66, 2221–2229.
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry III, C.E., Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J.E., Taylor, K., Whitehead, S., Barrell, B.G., 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393, 537–544.
- Dye, C., Scheele, S., Dolin, P., Pathania, V., Raviglione, M.C., 1999. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *JAMA* 282, 677–686.
- Gazdik, M.A., McDonough, K.A., 2005. Identification of cyclic AMP-regulated genes in *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria under low-oxygen conditions. *J. Bacteriol.* 187, 2681–2692.
- Kim, Y.R., Kim, S.Y., Kim, C.M., Lee, S.E., Rhee, J.H., 2005. Essential role of an adenylate cyclase in regulating *Vibrio vulnificus* virulence. *FEMS Microbiol. Lett.* 243, 497–503.
- Kimura, Y., Ohtani, M., Takegawa, K., 2005. An adenyl cyclase, CyaB, acts as an osmosensor in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 187, 3593–3598.
- Linder, J.U., Schultz, J.E., 2003. The class III adenyl cyclases: multi-purpose signalling modules. *Cell. Signal.* 15, 1081–1089.
- Linder, J.U., Schultz, A., Schultz, J.E., 2002. Adenyl cyclase Rv1264 from *Mycobacterium tuberculosis* has an autoinhibitory N-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 277, 15271–15276.
- Lowrie, D.B., Jaccottet, P.S., Ratcliffe, N.A., 1975. *Mycobacterium microti* may protect itself from intracellular destruction by releasing cyclic AMP into phagosomes. *Nature* 254, 600–602.
- McCue, L.A., McDonough, K.A., Lawrence, C.E., 2000. Functional classification of cNMP-binding proteins and nucleotide cyclases with implications for novel regulatory pathways in *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res.* 10, 204–219.
- Petersen, S., Young, G.M., 2002. Essential role for cyclic AMP and its receptor protein in *Yersinia enterocolitica* virulence. *Infect. Immun.* 70, 3665–3672.
- Rickman, L., Scott, C., Hunt, D.M., Hutchinson, T., Menendez, M.C., Whalan, R., Hinds, J., Colston, M.J., Green, J., Buxton, R.S., 2005. A member of the cAMP receptor protein family of transcription regulators in *Mycobacterium tuberculosis* is required for virulence in mice and controls transcription of the *rpfA* gene coding for a resuscitation promoting factor. *Mol. Microbiol.* 56, 1274–1286.
- Russell, D.G., 2001. *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 569–577.
- Sander, P., Springer, B., Böttger, E.C., 2001. Gene replacement in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG using *rpsL*<sup>+</sup> as a dominant negative selectable marker. In: Parish, T., Stoker, N.G. (Eds.), *Methods in Molecular Medicine: Mycobacterium tuberculosis* Protocols. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 93–104.
- Susstrunk, U., Pidoux, J., Taubert, S., Ullmann, A., Thompson, C.J., 1998. Pleiotropic effects of cAMP on germination, antibiotic biosynthesis and morphological development in *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* 30, 33–46.
- Tews, I., Findeisen, F., Sinning, I., Schultz, A., Schultz, J.E., Linder, J.U., 2005. The structure of a pH-sensing mycobacterial adenyl cyclase holoenzyme. *Science* 308, 1020–1023.
- Vergne, I., Chua, J., Singh, S.B., Deretic, V., 2004. Cell biology of *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 367–394.